

Aus dem Zentrum der Physiologie  
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Institut für kardiovaskuläre Physiologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Busse)

**Rolle der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1/2 an der Cannabinoid-  
induzierten Hemmung EDHF-vermittelter Gefäßrelaxation**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Daniel Bredenkötter  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2004

**Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter**

**Referent: PD Dr. R. P. Brandes**

**Korreferent: Prof. Dr. Dr. G. Geisslinger**

**Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2004**

# INHALTSVERZEICHNIS

## 1. Einleitung

1.1 Endothel-vermittelte Gefäßrelaxation .....	2
1.2 Endothel-vermittelte Hyperpolarisation .....	5
1.2.1 Rolle von Calcium und K <sup>+</sup> -Kanälen .....	6
1.2.2 Sind Epoxyeicosatriensäuren (EETs) EDHF? .....	7
1.2.3 Sind K <sup>+</sup> -Ionen EDHF? .....	8
1.2.4 Beteiligung von gap junctions an der endothelial-vermittelten Hyperpolarisation und Relaxation .....	9
1.2.5 Ist das endogene Cannabinoid Anandamid ein EDHF ? .....	11
1.3 Ziel der Arbeit .....	12

## 2. Material und Methoden

2.1 Arterienpräparate .....	13
2.2 Organbad-Untersuchungen .....	13
2.2.1 Aufbau und Durchführung .....	13
2.3 Membranpotentialmessungen von RCA-Segmenten .....	17
2.4 Zellisolierung und Zellkultivierung .....	17
2.5 Western Blot Analysen .....	18
2.6 Radioaktive metabolische Darstellung des phosphorylierten gap junction- Proteins Connexin 43 .....	19
2.7 Statistik .....	20
2.8 Substanzen .....	20

## 3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Cannabinoiden auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation von Schweinekoronararterien .....	22
3.2 Effekte einer Hemmung von ERK1/2 auf die Cannabinoid-induzierte Hemmung EDHF-vermittelter Gefäßprozesse .....	23

3.3 Einfluss von $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol und PD98059 auf die EDHF-vermittelte Hyperpolarisation von Schweinekoronararterien .....	26
3.4 Einfluss von Cannabinoiden auf die Phosphorylierung von ERK1/2 .....	27
3.5 Effekt von $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol auf die Connexin-Phosphorylierung in menschlichen Endothelzellen .....	29
3.6 Effekt von Bradykinin und 11,12-Epoxyeicosatriensäure auf die Phosphorylierung von Connexin 43 und ERK1/2 .....	30
3.7 Einfluss von Hemmstoffen der gap junctions auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien .....	32
3.8 Effekt des Adenylzyklase-Inhibitors 2'5'-Dideoxyadenosin auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien .....	34
4. Diskussion	
4.1 Effekt von Agonisten des CB <sub>1</sub> -Cannabinoidrezeptors auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation .....	35
4.2 Effekt von Cannabinoiden auf die MAP-Kinasen ERK1/2 .....	37
4.3 Effekt von CB <sub>1</sub> -Rezeptoragonisten auf zelluläre Strukturen und Signaltransduktionswege .....	37
4.4 Rolle des CB <sub>1</sub> -Rezeptors .....	39
4.5 Beteiligung von ERK1/2 an der Cannabinoid-induzierten Hemmung EDHF-vermittelter Hyperpolarisation und Relaxation .....	40
4.6 Einfluss von ERK1/2 auf die Funktion von gap junctions in Endothelzellen ..	41
4.7 Rolle von myoendothelialen gap junctions an der EDHF-vermittelten Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien.....	42
4.8 Effekt von 11,12-EET und Bradykinin auf die Aktivität von ERK1/2 .....	44
5. Zusammenfassung .....	46
6. Literatur .....	49

## Verzeichnis der Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB-Rezeptor	Cannabinoidrezeptor
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
Cx43	Connexin 43
CYP	Cytochrom P <sub>450</sub>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDRF	endothelium derived relaxing factor
EDHF	endothelium derived hyperpolarising factor
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EET	Epoxyeicosatriensäure
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinasen 1/2
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
HUVEC	Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene
HU210	3-(1,1-Dimethylheptyl)-(-)-11-Hydroxy- $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol
L-NA	N <sup>ω</sup> -Nitro-L-Arginin
MAP-Kinase	mitogen aktivierte Proteinkinase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SEM	Standardfehler der Standardabweichung
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
$\Delta^9$ -THC	$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol
U46619	9,11-Dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Epoxymethanoprostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub>



## 1. Einleitung

Bis in die siebziger Jahre wurde das Endothel als einschichtige Zellschicht mit direktem Blutkontakt nur für eine verhältnismäßig unveränderliche inerte Innenauskleidung der Gefäße ohne spezifische Funktionen gehalten. Im menschlichen Körper existieren ungefähr  $10^{13}$  Endothelzellen, die die Fläche eines Fußballfeldes, also etwa  $6000\text{m}^2$ , bedecken und ca. 1500g wiegen. Die Entdeckung von Prostazyklin Ende der siebziger Jahre und seines endothelialen Ursprungs führte zu der Idee, dass vom Endothel Eikosanoide produziert werden müssen, und in weiterer Instanz zur Feststellung, dass Endothelzellen Ursprungsort von Autakoiden sind, die den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur regulieren (Moncada *et al.*, 1976; Moncada *et al.*, 1979). 1980 machten Furchgott und Zawadzki die bahnbrechende Entdeckung, dass nach Stimulation endothelintakter Gefäße mit Acetylcholin vom Endothel eine oder mehrere Substanzen abgegeben werden, die zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führen (Furchgott & Zawadzki, 1980). Vier Jahre später prägten sie den Begriff des "endothelium derived relaxing factor" (EDRF) (Furchgott *et al.*, 1984). Weitere drei Jahre später wurde die Identität des EDRF geklärt, indem parallel die Forschungsgruppen um Ignarro sowie um Moncada nachweisen konnten, dass es sich bei EDRF um Stickstoffmonoxid (NO) handelt bzw. um ein Produkt, welches NO freisetzt (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987). Die Wichtigkeit von NO wurde mit der Einführung von Hemmstoffen der NO-Synthase, welche aus L-Arginin NO synthetisiert, deutlich, da diese Substanzen zu Vasokonstriktion und erhöhtem Blutdruck in vivo führten (Rees *et al.*, 1989). Dies deutete auf eine kontinuierliche basale NO-Ausschüttung des gesunden Endothels hin und unterstrich die Bedeutung des Endothels in der Regulation des Gefäßtonus. 1998 bekamen Furchgott, Murad und Ignarro für ihre Arbeiten über die Rolle des Stickstoffmonoxids als Botenstoff im Herz-Kreislaufsystem den Medizin-Nobelpreis. Heute gilt das Endothel als ein hochdifferenziertes, endokrin und parakrin aktives, ubiquitär im Organismus vorkommendes Organ (Busse & Fleming, 1993), welches bei der Regulation des Gefäßtonus und Blutdrucks, der Gerinnung und Fibrinolyse sowie der Thrombose-resistenz der Gefäßwände (Radomski *et al.*, 1987) eine zentrale Rolle spielt. Daneben erfüllt das Endothel wichtige Funktionen bei der Immunantwort (Harlan, 1987), bei Entzündungsreaktionen und im Rahmen der Steuerung der Gefäßpermeabilität (Clauss *et al.*, 1990), beim Transport von Makromolekülen durch die Gefäßwand (Kaiser & Sparks, 1987) sowie bei der Regulation vasoproliferativer Vorgänge (Garg *et al.*, 1989).

Ist das Endothel in seiner Funktion und Struktur geschädigt, wird dies häufig als „endotheliale Dysfunktion“ bezeichnet. Dieser Begriff umschreibt einige pathologische Sachverhalte, die eine verminderte antikoagulatorische und antientzündliche Eigenschaft des Endothels, eine beeinträchtigte Modulation des Gefäßwachstums sowie eine Dysregulation vaskulärer Remodelling-Prozesse miteinbeziehen (Gimbrone *et al.*, 1995). Andererseits versteht man unter „endothelialer Dysfunktion“ die Verminderung der Endothel-abhängigen Gefäßrelaxation, verursacht durch den Verlust der Stickstoffmonoxid-Aktivität in der Gefäßwand. Hauptverantwortlich für die endotheliale Dysfunktion ist nach heutiger Sicht die Inaktivierung des Stickstoffmonoxids durch oxidativen Stress, der im Rahmen einiger pathophysiologischer Prozesse wie u.a. Hypercholesterinämie, Atherosklerose, Zigarettenrauchen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Herzinsuffizienz eine große Rolle spielt. Das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion hat v.a. im koronaren Stromgebiet (Schächinger *et al.*, 2000), aber auch in der Peripherie (Heitzer *et al.*, 2001) prognostische Bedeutung für die Zunahme einer Atherosklerose bzw. koronaren Herzkrankheit sowie für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse. Durch diese Erkenntnisse wird die Bedeutung eines funktionierenden Endothels hervorgehoben.

## 1.1 Endothel-vermittelte Gefäßrelaxation

Das Endothel ist als endokrines und parakrines Organ in der Lage, vasoaktive Substanzen zu produzieren und an die unmittelbare Umgebung abzugeben. Zu diesen gefäßwirksamen Autakoiden gehören auf der einen Seite vasokonstriktive Mediatoren wie das Peptid Endothelin, auf der anderen Seite die für die Regulation des lokalen Gefäßtonus äußerst wichtigen vasodilatierenden Substanzen NO, Prostazyklin und der in seiner chemischen Struktur noch umstrittene "endothelium derived hyperpolarising factor" (EDHF).

NO entsteht in einer ATP-unabhängigen Reaktion aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff. Diese Reaktion wird durch ein dimerisches Enzym katalysiert, welches zur Familie der NO-Synthasen (NOS) gehört. Es gibt drei verschiedene Isoformen der NOS, die sich auf unterschiedlichen Genloci befinden und bereits geklont werden konnten. Man unterscheidet die beiden konstitutiven Synthasen endotheliale NOS (eNOS oder NOS III) und neuronale NOS (nNOS oder NOS I) von der induzierbaren Synthase (iNOS oder NOS II). Die wesentlichen Unterschiede der NO-Synthasen liegen in ihrem Aktivierungsmuster und dem Ort ihrer Expression. Die eNOS wird überwiegend in Endothelzellen exprimiert und benötigt

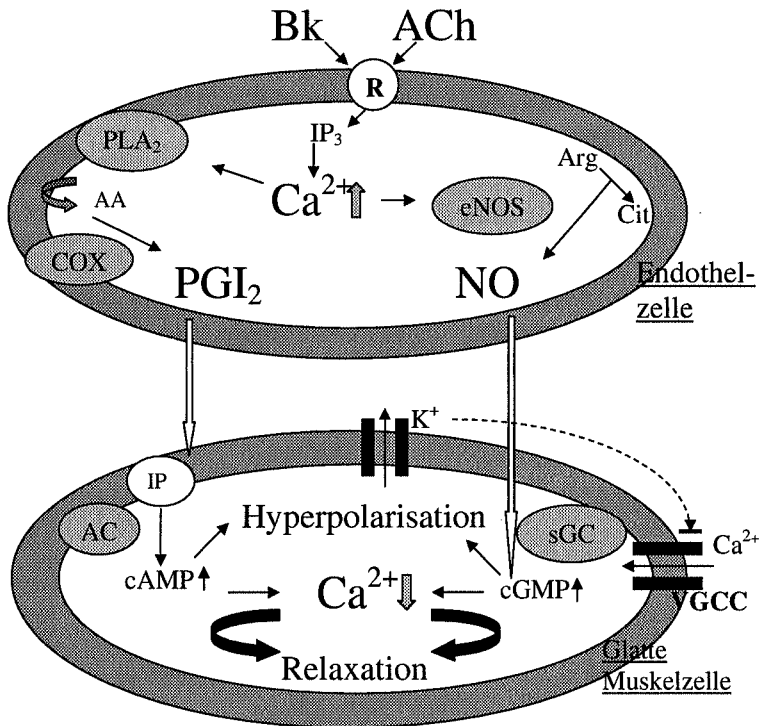


für ihre Aktivierung einen Calcium-Calmodulin-Komplex (Busse & Mülsch, 1990). Neuere Befunde beschreiben daneben auch einen Calcium-Calmodulin-unabhängigen Aktivierungsweg (Dimmeler *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1999). Die nNOS findet sich hauptsächlich in Nervenzellen und ist ähnlich der eNOS auf den Calcium-Calmodulin-Komplex angewiesen. Dagegen ist die induzierbare NOS, welche überwiegend in Makrophagen vorkommt, aufgrund der festen Bindung von Calmodulin an das Enzym vom intrazellulären Calcium praktisch unabhängig. In pathologischen Situationen wird sie durch Zytokine, Lipopolysaccharide und andere bakterielle Endotoxine induziert und produziert darauf größere Mengen an NO (nano- bis millimolar) und dies über einen wesentlich längeren Zeitraum (Stunden-Tage) als die konstitutiven Formen (piko- bis nanomolar; Minuten-Stunden).

Die Aktivierung der eNOS geschieht rezeptorabhängig durch verschiedene Agonisten wie Acetylcholin, Bradykinin, Histamin, Adenosindiphosphat (ADP), Substanz P oder Serotonin, daneben aber auch rezeptorunabhängig durch einen erniedrigten Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), sowie Endothelzelldehnung und Schubspannung (Änggård *et al.*, 1992). eNOS katalysiert die Bildung von L-Citrullin und NO aus L-Arginin und  $O_2$ . Von der Endothelzelle diffundiert NO dann in die benachbarte glatte Muskelzelle und aktiviert dort die lösliche Guanylylzyklase (Katsuki *et al.*, 1977). Das daraufhin ansteigende zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) aktiviert seinerseits cGMP-abhängige Proteinkinasen, die u.a. über eine Senkung des intrazellulären Calciumspiegels zur Muskelrelaxierung und Gefäßdilatation führen. Die kontinuierliche NO-Synthese durch die Endothelzellen trägt so zur Regulation des Blutdrucks bei. Klinisch nutzt man diesen Mechanismus schon seit langem durch den Einsatz kurzwirksamer NO-freisetzender Vasodilatoren (Nitroglycerin, Natriumnitroprussid).

In geringerem Umfang als NO ist das vom Endothel produzierte vasoaktive Autakoid Prostazyklin ( $PGI_2$ ) an der physiologischen Blutdruckregulation beteiligt. Hingegen gilt Prostazyklin, dessen gefäßerweiternde Wirkung bereits in den siebziger Jahren entdeckt und intensiv untersucht wurde (Moncada *et al.*, 1976), als potentester endogener Inhibitor der Thrombozytenaggregation sowie neben NO als wichtiger Vermittler der Thromboseresistenz endothelintakter Gefäßwände (Radomski *et al.*, 1987; Darius *et al.*, 1995). Prostazyklin spielt unter pathophysiologischen Bedingungen wie bei hämodynamischem Stress für die Regulation der regionalen Durchblutung eine wichtige Rolle (Terragno *et al.*, 1977). Nach mechanischen oder chemischen Reizen sowie rezeptorgebunden kommt es im Endothel zu einer Freisetzung von Calcium. Das erhöhte intrazelluläre Calcium aktiviert die Calcium-abhängige Phospholipase  $A_2$ , welche Arachidonsäure aus Lipiden der Zellmembran mobilisiert. Die Arachidonsäure wird dann von der Cyclooxygenase zu Prostaglandinen (z.B.

Prostazyklin) verstoffwechselt (Lückhoff *et al.*, 1988; White & Martin, 1989). Prostazyklin wirkt an der glatten Muskelzelle im Gegensatz zu NO über spezifische Membranrezeptoren, deren Aktivierung über G-Proteine gekoppelt zu einer Stimulation der Adenylzyklase und damit zu einem intrazellulären Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führt. Dies hat wiederum ein Absinken des intrazellulären Calciums und damit eine Gefäßrelaxation zur Folge.



**Abb.1:** Die Abbildung zeigt vereinfacht die Wirkungsweise der vom Endothel produzierten vasodilatierenden Faktoren Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und Stickstoffmonoxid (NO). (AA: Arachidonsäure; AC: Adenylzyklase; ACh: Acetylcholin; Arg: L-Arginin; BK: Bradykinin; Cit: L-Citrullin; COX: Cyclooxygenase; eNOS: konstitutive endotheliale NO-Synthase; IP: Prostazyklinrezeptor; IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat; PLA<sub>2</sub>: Phospholipase A<sub>2</sub>; sGC: lösliche Guanylatzyklase; VGCC: spannungsabhängiger Calciumkanal)

## 1.2 Endothel-vermittelte Hyperpolarisation

Bereits in den achtziger Jahren konnte beobachtet werden, dass die Endothel-abhängige Relaxation von einer Endothel-abhängigen Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur begleitet wird (Bolton *et al.*, 1984; Feletou & Vanhoutte, 1988; Chen *et al.*, 1988). Die hyperpolarisierende Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur schrieb man einer Substanz zu, die nach einer Aktivierung des muskarinergen Acetylcholinrezeptors durch Carbachol vom Endothel freigesetzt wird (Bolton *et al.*, 1984). Diese Relaxation und Hyperpolarisation zeigte sich weitestgehend unempfindlich gegenüber spezifischen Hemmstoffen von NO-Synthasen und Cyclooxygenasen (Nagao & Vanhoutte 1992; Garland *et al.*, 1992) und führte zudem nicht zu gesteigerten intrazellulären Spiegeln an zyklischen Nukleotiden in den glatten Muskelzellen, wie dies bei NO- sowie Prostazyklin-abhängigen Relaxationen zu beobachten ist (Taylor *et al.*, 1988; Cowan & Cohen, 1991; Mombouli *et al.*, 1992). Hinter dieser Endothel-abhängigen NO- und PGI<sub>2</sub>-unabhängigen Gefäßrelaxation vermutete man eine neue vom Endothel freigesetzte Substanz und gab ihr, da die Relaxationen mit einer Hyperpolarisation der glatten Muskulatur assoziiert waren, den Namen "endothelium derived hyperpolarising factor" (EDHF). Es konnte gezeigt werden, dass eine Änderung des Membranpotentials um wenige mV eine deutliche Änderung des Gefäßquerschnitts zur Folge haben kann (Nelson & Quayle, 1995; Brayden & Nelson, 1992). Auf der Basis dieser Erkenntnisse lag die Vermutung nahe, dass die Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur der Mechanismus EDHF-induzierter Relaxationen ist (Nagao & Vanhoutte, 1991; Garland & McPherson; 1992) und hyperpolarisierende Stimuli zur Gefäßdilatation beitragen.

Über den exakten Mechanismus, mit dem EDHF zur Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt, herrscht bis heute trotz intensiver Bemühungen keine eindeutige Klarheit. Ging man bisher von einem diffusiblen, vom Endothel auf die glatte Gefäßmuskelzelle übertragbaren humoralen Faktor aus (Popp *et al.*, 1996; Popp *et al.*, 1998, Mombouli *et al.*, 1996), so mehren sich jetzt die Hinweise, dass es nach der Aktivierung eines endothelialen Rezeptors durch Acetylcholin, Substanz P oder Bradykinin über eine Steigerung des intrazellulären Calcium-Spiegels (Lückhoff *et al.*, 1988; Johns *et al.*, 1988) zur Öffnung endothelialer K<sup>+</sup>-Kanäle und damit zur endothelialen Hyperpolarisation kommt. Für die Verbindung der endothelialen Hyperpolarisation mit der nachfolgenden Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle werden verschiedene Mechanismen diskutiert.

### 1.2.1 Rolle von Calcium und $K^+$ -Kanälen

Für die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation und Hyperpolarisation ist ein intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Anstieg in der Endothelzelle von entscheidender Bedeutung (Nilius & Droogmans, 2001). Zu diesem Anstieg kommt es u.a. nach Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors durch einen endothelialen Rezeptoragonisten wie Bradykinin oder Acetylcholin (Lückhoff *et al.*, 1988; Johns *et al.*, 1988). In Studien mit  $Ca^{2+}$ -Ionophor A23187 oder Hemmstoffen der sarkolemmalen  $Ca^{2+}$ -ATPase wie Thapsigargin oder Cyclopiazonsäure konnten alleinig durch den von diesen Substanzen ausgelösten  $Ca^{2+}$ -Anstieg EDHF-vermittelte Prozesse ausgelöst werden (Illiano *et al.*, 1992, Fukao *et al.*, 1995). Durch den erhöhten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel kommt es zu einer Aktivierung  $Ca^{2+}$ -abhängiger ( $K_{Ca}$ )  $K^+$ -Kanäle. Durch Studien mit Toxinen, welche spezifisch Calcium-abhängige  $K_{Ca}$ -Kanäle hemmen, konnten in den letzten Jahren die Erkenntnisse hinsichtlich der in die EDHF-vermittelten Prozesse involvierten  $K_{Ca}$ -Kanäle deutlich gesteigert werden. EDHF-vermittelte Gefäßhyperpolarisationen und Relaxationen konnten durch eine Kombination aus Apamin [hemmt  $K_{Ca}$ -Kanäle mit kleiner Leitfähigkeit; sog. "small conductance  $K_{Ca}$ -channels" ( $SK_{Ca}$ )] und Charybdotoxin [hemmt unselektiv  $K_{Ca}$ -Kanäle mit großer Leitfähigkeit; sog. "large conductance  $K_{Ca}$ -channels" ( $BK_{Ca}$ ), und  $K_{Ca}$ -Kanäle mit mittlerer Leitfähigkeit; sog. "intermediate conductance  $K_{Ca}$ -channels" ( $IK_{Ca}$ ), sowie einige spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle] komplett aufgehoben werden (Garland & Plane, 1996; Zygmunt & Hoggstatt, 1996). Scyllatoxin, welches ebenfalls  $SK_{Ca}$ -Kanäle hemmt, konnte den Effekt von Apamin nachahmen (Corriu *et al.*, 1996), was die Beteiligung von  $SK_{Ca}$ -Kanälen an der EDHF-vermittelten Hyperpolarisation und Relaxation nahe legt. Hingegen scheinen  $BK_{Ca}$ -Kanäle nicht essentiell an EDHF-vermittelten Prozessen beteiligt zu sein, denn der selektive  $BK_{Ca}$ -Hemmer Iberitoxin konnte in Versuchen den Effekt von Charybdotoxin nicht imitieren (Zygmunt & Hoggstatt, 1996, Chataigneau *et al.*, 1998). Glibenclamid als Hemmer des ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanals zeigte auf die EDHF-vermittelten Gefäßprozesse keinen Einfluss, so dass eine größere Rolle des ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanals ebenfalls ausgeschlossen werden konnte. Weiterführende Untersuchungen bezüglich der Lokalisation der für die EDHF-vermittelten Gefäßrelaxationen und Hyperpolarisationen wichtigen Kanäle führten zu dem Schluss, dass die  $SK_{Ca}$ - und  $IK_{Ca}$ -Kanäle vornehmlich in Endothelzellen lokalisiert sind (Marchenko & Sage, 1996; Cai *et al.*, 1998; Burnham *et al.*, 2002). Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass der erste Schritt der Endothel-vermittelten Hyperpolarisation und Relaxation eine  $Ca^{2+}$ -aktivierte Öffnung von endothelialen  $SK_{Ca}$ - und  $IK_{Ca}$ -Kanälen mit konsekutiver Hyperpolarisation des

Endothels sowie Efflux von  $K^+$  in den myoendothelialen Raum beinhaltet. Die Übertragung der endothelialen Hyperpolarisation in eine Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur wird momentan noch kontrovers diskutiert. Eine mögliche Rolle hierbei spielen ein vom Endothel produziertes Cytochrom-P<sub>450</sub>-Derivat der Arachidonsäure, ferner die Übertragung der endothelialen Hyperpolarisation zum Gefäßmuskel über myoendotheliale gap junctions sowie  $K^+$ , welches nach der Diffusion in den myoendothelialen Raum dort myozytäre  $K^+$ -Kanäle öffnet bzw. die  $Na^+/K^+$ -ATPase aktiviert.

### 1.2.2 Sind Epoxyeicosatriensäuren (EETs) EDHF?

Epoxyeicosatriensäuren (EETs) sind Cytochrom-P<sub>450</sub>-Epoxygenase-(CYP)Derivate der Arachidonsäure und spielen bei der Regulation des lokalen Gefäßtonus eine wichtige Rolle. Die eindeutigsten Hinweise, dass EDHF-vermittelte Hyperpolarisation und Relaxation durch ein kurzlebige CYP-Derivat der Arachidonsäure verursacht werden, existieren für Koronargefäße vom Rind, Schwein, Kaninchen und Menschen (Hecker *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 1996; Kessler *et al.*, 1996; Arima *et al.*, 1997; Weintraub *et al.*, 1997; Widmann *et al.*, 1998). In diesen Gefäßen konnten die EDHF-Antworten durch CYP-Hemmstoffe blockiert werden. In Herzkranzgefäßen des Schweins sowie in Widerstandsgefäßen beim Hamster konnte zudem gezeigt werden, dass durch die spezifische Hemmung von CYP2C mit Antisense-Oligonukleotiden EDHF-vermittelte Gefäßprozesse vollständig aufgehoben werden konnten (Fisslthaler *et al.*, 1999; Bolz *et al.*, 2000). Daneben wurden verstärkte EDHF-Antworten nach Gabe von CYP-Induktoren wie  $\beta$ -Naphthoflavon beobachtet (Popp *et al.*, 1996). Es ist jedoch fraglich, ob EETs in ausreichenden Mengen vom Endothel freigesetzt werden und eine direkte Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur auslösen, wohingegen das grundsätzliche Phänomen der Agonisten- und Schubspannungs-induzierten EET-Bildung unstrittig ist (Popp *et al.*, 1998; Gebremedhin *et al.*, 1998). Endogen gebildete EETs wirken ebenso wie exogen zugefügte EETs über die Öffnung von myozytären  $BK_{Ca}$ -Kanälen, welche empfindlich gegenüber Tetraethylammonium, Iberitoxin oder Charybdotoxin sind, hyperpolarisierend auf glatte Gefäßmuskelzellen. Die für die EDHF-Antwort wichtigen  $SK_{Ca}$ - und  $IK_{Ca}$ -Kanäle werden nur gering beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass diffundierende EETs wahrscheinlich nicht für die Mehrzahl der EDHF-Antworten verantwortlich gemacht werden können. Neuere Hinweise lassen die Vermutung zu, dass EETs am ehesten durch "second messenger"-Funktionen im Endothel eine

entscheidende Rolle in der Entstehung der endothelialen Hyperpolarisation und damit in der Initiation der EDHF-vermittelten Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle spielen. Diskutiert werden ein verstärkter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Endothelzelle durch EET-Einfluss nach Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Hoebel *et al.*, 1997), ferner die Sensibilisierung von endothelialen  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanälen gegenüber Calcium (Li & Campbell, 1997; Baron *et al.*, 1997). EETs zeigen auch Einfluss auf myoendotheliale gap junctions (Popp *et al.*, 2002). Möglicherweise wird über diesen Weg die Übertragung der Hyperpolarisation vom Endothel zur glatten Muskelzelle gebahnt. Dies ist z.Zt. Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

### 1.2.3 Sind $\text{K}^+$ -Ionen EDHF?

In einigen Gefäßen kommt es im Rahmen der Hyperpolarisation des Endothels nach Öffnen der endothelialen  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ - und  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Kanäle zu einem Anstieg der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Ionen im myoendothelialen Raum. Diese geringen Anstiege (6 bis max. 20mM) des extrazellulären  $\text{K}^+$  verursachen Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur durch Aktivierung von einwärts-gleichrichtenden  $\text{K}^+_{\text{IR}}$ -Kanälen (Knot *et al.*, 1996) sowie der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Edwards *et al.*, 1998). Die Hyperpolarisation des Endothels ist hemmbar durch die Kombination aus Charybdotoxin und Apamin, die Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzelle durch die Kombination aus Barium (hemmt bei Konzentrationen  $<50\mu\text{M}$  selektiv  $\text{K}^+_{\text{IR}}$ -Kanäle) und Ouabain (hemmt in submikromolaren Konzentrationen selektiv die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase; Isoform  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ ) (Harris *et al.*, 2000). Durch Applikation von 5mM  $\text{K}^+$ -Ionen in den myoendothelialen Raum konnten EDHF-Antworten in der Arteria hepatica sowie in Mesenterialarterien der Ratte hervorgerufen werden, die den durch Acetylcholin ausgelösten EDHF-Antworten glichen. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass  $\text{K}^+$ -Ionen, die durch  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ - und  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Kanäle des Endothels in den myoendothelialen Raum diffundieren, ein universeller EDHF seien (Edwards *et al.*, 1998), wobei dieses Modell besonders bei der Ratte zu gelten scheint. In der Carotis vom Meerschweinchen sowie in Schweinekoronararterien hingegen konnte die Kombination von Barium und Ouabain die Acetylcholin-induzierten EDHF-Antworten nicht signifikant hemmen (Quignard *et al.*, 1999). Lacy und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in Mesenterialarterien der Ratte Ouabain zwar die  $\text{K}^+$ -Ionen-vermittelte Relaxation aufheben konnte, nicht hingegen die durch Acetylcholin ausgelöste Relaxation, was gegen  $\text{K}^+$ -Ionen als EDHF in diesen Gefäßen spricht (Lacy *et al.*,

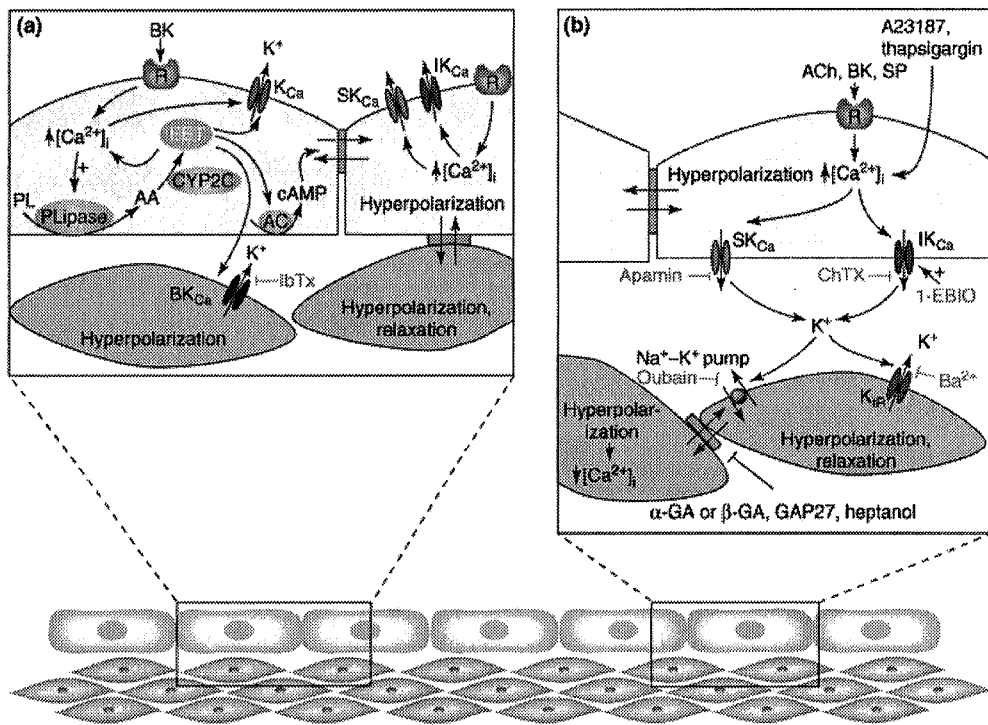
2000). Ding und Mitarbeiter zeigten in Mesenterialarterien von eNOS  $-/-$  und  $+/+$  Mäusen ähnliche Ergebnisse. Hier konnte die Kombination aus Ouabain und Barium lediglich Relaxationen induziert durch  $K^+$ -Ionen, nicht hingegen ACh-induzierte Relaxationen hemmen. Zusätzlich konnte die Hemmung der endothelialen  $SK_{Ca}$ - und  $IK_{Ca}$ -Kanäle durch die Kombination aus Charybdotoxin und Apamin lediglich die ACh-vermittelte nicht hingegen die  $K^+$ -vermittelte Relaxation beeinflussen (Ding *et al.*, 2000).

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass  $K^+$ -Ionen in manchen Gefäßen an der EDHF-vermittelten Hyperpolarisation und Relaxation mitwirken, jedoch keineswegs ein universeller EDHF sind.

#### **1.2.4 Beteiligung von gap junctions an der endothelial-vermittelten Hyperpolarisation und Relaxation**

Es konnte gezeigt werden, dass gap junctions zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskelzelle, v.a. in Widerstandsgefäßen, eine wichtige Rolle bei der endothelialen Regulation des Gefäßtonus spielen. Sie bilden einen aus Connexin-Proteinen – in Endothelzellen werden überwiegend die Proteine Connexin 40 und 43 exprimiert (Hong & Hill, 1998) – geformten Ionenkanal, der die Passage von kleinen wasserlöslichen Molekülen bis zu einer Größe von etwa 1kDa sowie von Ionen zwischen Endothel und glatter Muskelzelle ermöglicht. Ein Transfer vom Endothel zur glatten Muskelzelle konnte in kleinen Arteriolen für  $Ca^{2+}$ , Signalmoleküle wie Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) sowie zyklische Nukleotide nachgewiesen werden (Rooney & Thomas, 1993; Sanderson *et al.*, 1994). Weitere Studien zeigen, dass Substanzen, die zu einer Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle führen, auch das Endothel in gleicher Weise hyperpolarisieren (Beny, 1990; Xia *et al.*, 1995). Die Verbindung zwischen dem EDHF-Phänomen und einem sich über myoendotheliale gap junctions ausbreitenden elektrischen Strom konnte bereits für verschiedene Gefäße in der Mikrozirkulation hergestellt werden wie z.B. für die Arterien des Retraktor-Muskels beim Hamster (Emerson & Segal, 2001). Ob gap junctions möglicherweise die Diffusion eines „hyperpolarisierenden Faktors“ wie z.B. cAMP ermöglichen und auf diese Art die Hyperpolarisation des Endothels auf den glatten Gefäßmuskel übertragen, ist noch nicht vollständig geklärt. Kontrovers diskutiert wird auch die Frage, ob myoendotheliale gap junctions am EDHF-Phänomen in größeren Arterien wie z.B. Schweinekoronarien beteiligt sind. Studien, die diese Beteiligung widerlegen, sind nicht selten im Hinblick auf die

Unkenntnis der genauen Wirkmechanismen der in diesen Studien verwendeten gap junction-hemmenden Substanzen zu hinterfragen. Um die Rolle der gap junctions bei Gefäßtonus-regulierenden Prozessen genauer zu verstehen, sind weitere Untersuchungen hinsichtlich ihrer Funktionen notwendig.



TRENDS in Pharmacological Sciences

**Abbildung 2 :** Die Abbildung zeigt die verschiedenen Ansätze zur Erklärung des EDHF-Phänomens:

a) Rolle von EETs sowie interendothelialen und myoendothelialen gap junctions ; AA=Arachidonsäure, AC=Adenylzyklase, BK=Bradykinin, CYP2C=CytochromP450Epoxygenase2C EETs=Epoxyeicosatriensäuren, IbTx=Iberiotoxin, PL=Membranphospholipide, PLipase=Phospholipase;  
b) Rolle von extrazellulären  $K^+$ -Ionen. ACh=Acetylcholin, ChTX=Charybdotoxin, 1-EBIO=1-Ethyl-2-Benzimidazolion,  $\alpha$ -GA=18- $\alpha$ -Glyzyrrhetinsäure;  $\beta$ -GA=18- $\beta$ -Glyzyrrhetinsäure, SP=Substanz P, aus (Busse et al., 2002)



### 1.2.5 Ist das endogene Cannabinoid Anandamid ein EDHF ?

Nachdem Randall *et al.* 1996 feststellen konnten, dass im mesenterialen Stromgebiet der Ratte das endogene Cannabinoid Anandamid ein potenter NO- und PGI<sub>2</sub>-unabhängiger vasodilatierender Faktor ist (Randall *et al.*, 1996) und diese gefäßerweiternden Effekte durch den selektiven CB<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten SR141716A sowie erhöhte extrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentrationen gehemmt werden konnten, wurde vorgeschlagen, dass Anandamid in diesen Gefäßen ein EDHF sei. Die Effekte von EDHF und Anandamid zeigten sich vergleichbar, da beide nur durch eine Kombination aus Charybdotoxin und Apamin gehemmt werden konnten (Randall & Kendall, 1998) und die Effekte von SR141716A spezifisch sind (Harris *et al.*, 1999).

Demgegenüber stehen Beobachtungen, dass Anandamid nicht die gleichen physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften von EDHF haben kann (Plane *et al.*, 1997; White & Hiley, 1997; Chataigneau *et al.*, 1998b) und dass CB<sub>1</sub>-Agonisten wie HU210 zwar in der Lage sind, einige Gefäße zu relaxieren, diese Relaxationen aber denjenigen, vermittelt durch EDHF, keinesfalls gleichen (Fleming *et al.*, 1999). Mombouli *et al.* konnten zeigen, dass Anandamid durch einen CB<sub>1</sub>-Rezeptor-unabhängigen Effekt in Endothelzellen Ca<sup>2+</sup> aus einem Caffein-sensitiven Speicher mobilisieren kann (Mombouli *et al.*, 1999). Ferner wird Anandamid durch eine spezifische Aminohydrolase in Arachidonsäure und Ethanolamid gespalten, woraus in weiteren Schritten COX-abhängig Prostazyklin sowie EETs produziert werden können (Pratt *et al.*, 1998). Daher kann Anandamid die EDHF-Produktion beeinflussen, ohne selber EDHF zu sein. Chaytor *et al.* berichteten 1999, dass die relaxierenden Effekte von Anandamid durch SR141716A gehemmt werden konnten und gleichzeitig die Luciferyellow-Farbstoffkopplung zwischen verbundenen COS-7 Zellen gehemmt wurde, wohingegen der CB<sub>1</sub>-Antagonist LY320135 keinen Effekt zeigte (Chaytor *et al.*, 1999). Diese Daten führten zu der Vermutung, dass SR141716A möglicherweise CB<sub>1</sub>-unabhängig seine Effekte durch Entkoppeln myoendothelialer gap junctions entfaltet.

### 1.3 Ziel der Arbeit

Trotz der gefäßrelaxierenden Wirkung der Cannabinoide, die wie vorgestellt möglicherweise über die Bahnung der myoendothelialen Zell-zu-Zell Kommunikation via gap junctions oder die Freisetzung eines EDHF vermittelt wird, konnte beobachtet werden, dass Cannabinoide nach Inkubation von Schweinekoronararterien sowie Arterien vom Kaninchen als potente Inhibitoren EDHF-vermittelter Relaxationen und Hyperpolarisationen wirken (Fleming *et al.*, 1999). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte des Cannabinoids  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) auf die EDHF-Signaltransduktionswege und die Zell-zu-Zell-Kommunikation via gap junctions in Gefäßzellen zu untersuchen und die zugrunde liegenden Signaltransduktionswege zu bestimmen. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Rolle der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), insbesondere derjenigen der extrazellulär regulierten Kinasen ERK1/2, da bekannt wurde, dass die Connexin-Proteine, welche eine gap junction formen, spezifische Phosphorylierungsstellen für ERK1/2 aufweisen (Zhou *et al.*, 1999).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Arterienpräparate

Für die Untersuchungen an Schweinekoronararterien fanden Schweineherzen von lokalen Schlachthöfen Verwendung. Direkt nach der Entnahme der Herzen wurden die Ventrikelspitzen beider Ventrikel abgeschnitten und die Herzen sowie die Koronarien mit 4°C kalter HEPES-Tyrode durchspült und in dieser Lösung ins Labor transportiert. Die HEPES-Tyrode setzte sich wie folgt zusammen (mmol/l): NaCl 140; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 1,3; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 10; Glukose 5 (pH 7,4 mit NaOH).

Im Labor erfolgte dann die Präparation des Hauptstamms der A. coronaria dextra (RCA) unter dem Binokular sowie die Befreiung des Gefäßes von epikardialem Fett und Bindegewebe. Anschließend wurde die RCA in 3-4mm breite Ringe geschnitten, ohne dabei das Endothel zu verletzen.

### 2.2 Organbad-Untersuchungen

#### 2.2.1 Aufbau und Durchführung

Die 3 bis 4mm breiten Arterienringe wurden unmittelbar nach der Präparation auf zwei Haken aus rostfreiem Stahl gespannt und in ein nach oben offenes gläsernes, durch ein Wasserbad konstant auf 37°C erwärmtes doppelwandiges Organbad gegeben. Die Innenwand des Organbades hatte eine silikonisierte Oberfläche, um mögliche Peptidadhäsionen zu vermeiden. Die Kammer enthielt 10ml Krebs-Henseleit-Lösung (pH 7,4) mit der folgenden Zusammensetzung (in mmol/l): NaCl 119; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 1,6; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; Ca<sup>2+</sup>-EDTA 0,026; Glukose 12. Dieser Puffer wurde stetig mit einem Carbogen-Gasgemisch, bestehend aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, begast.

Der obere der metallenen Haken war an ein Übertragungssystem angeschlossen, welches aus einem Kraftaufnehmer (F30 Force-Tranducer) von Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus und einem Zwei-Kanal-Brückenverstärker zusammengesetzt war. Diese Anordnung ermöglichte die exakte Messung isometrischer Kraftänderungen, die als Spannungsänderung auf x/y-Mehrkanalschreibern (Rikadenki R40 und R80) aufgezeichnet wurden. Die oben

genannte Messgeräte-Konfiguration erfuh vor jedem Experiment eine erneute Eichung mit genormten Gewichten. Die Registrierung der Kraftänderung erfolgte entsprechend der Eichung mittels Eichgewichten in Gramm.

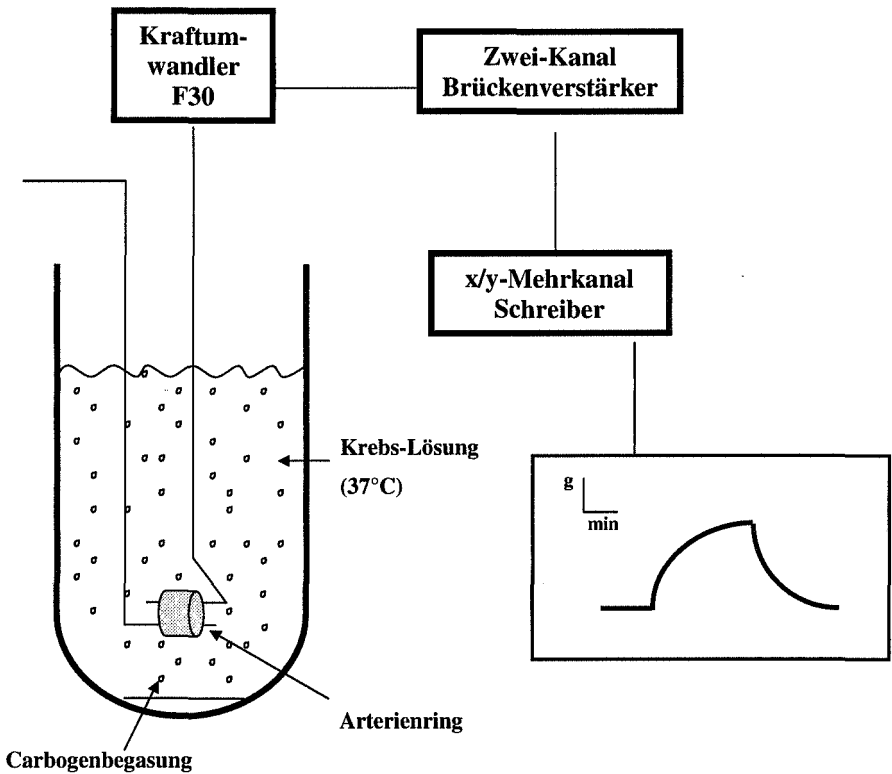
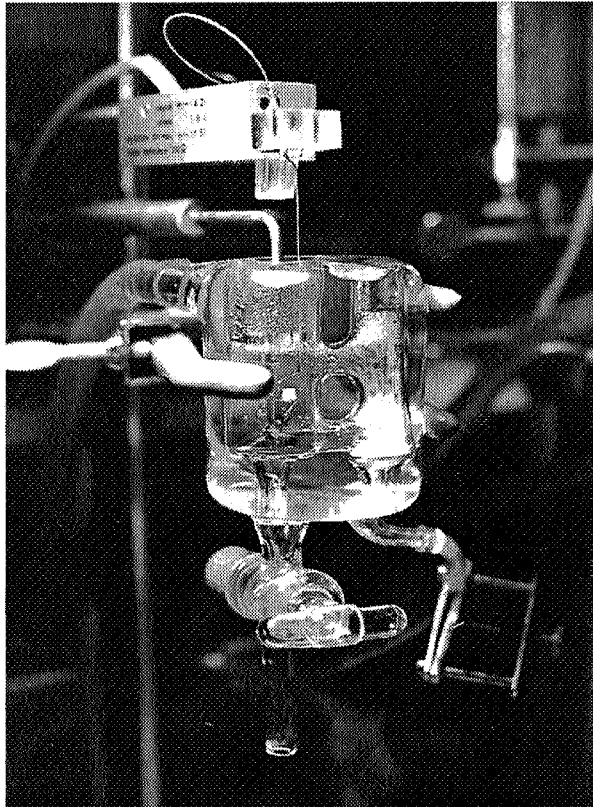


Abbildung 3: Organbadanlage in schematischer Darstellung

Die auf die Metallhaken gebrachten Arterienringe wurden über ca. 30min in kleinen Schritten von jeweils 1g auf eine Spannung von 5g passiv vorgedehnt, um bei der späteren Registrierung der Kraftänderung isotone Kontraktionen der Gefäßringe zu vermeiden. Die passive Vorspannung diente während des Versuchs als Nulllinie, von der aus aktive Kontraktionen gemessen wurden.

Anschließend erfolgte die dreimalige Kontraktion mit kaliumreicher Krebs-Henseleit-Lösung (KCl 80mM; NaCl 40mM; sonstige Zusammensetzung s.o.). Nach Erreichen eines Kontraktionsplateaus wurden die Gefäßringe wieder durch das Auswaschen der Organbäder mit normaler Krebs-Henseleit-Lösung (KCl 4,7mmol/l) relaxiert und auf die passive Vorspannung von 5g äquilibriert. Die Stärke der dritten durch Kalium ausgelösten Kontraktion wurde als die maximale Kontraktion des Gefäßes definiert. Im nächsten Schritt sollte die Intaktheit des Gefäßendothels geprüft werden. Dazu wurden die Gefäßringe nach Äquilibration im Organbad mit kumulativ steigenden Dosen des Thromboxan-Analogons U46619 (9,11-Dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Epoxymethanoprostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> ), beginnend bei 0,1 $\mu$ M soweit vorkontrahiert, dass ein stabiles Kontraktionsplateau erreicht wurde. Danach erfolgte die einmalige Gabe von 1 $\mu$ M Bradykinin. Die endothelintakten Gefäßringe zeigten daraufhin eine deutliche Gefäßrelaxation von mindestens 80%, Endothel-beschädigte Gefäßringe – wenn überhaupt – nur sehr geringe Relaxationen. Anschließend wurde der Organbadinhalt mehrfach mit Krebslösung ausgetauscht und eine erneute Äquilibration auf 5g abgewartet.

Zur Untersuchung der EDHF-Antwort mussten nun die Cyclooxygenase sowie die NO-Synthase gehemmt werden, um die Bildung von vasoaktiven Prostanoiden sowie NO zu unterbinden. Dies geschah durch die Zugabe des unselektiven COX-Hemmers Dicofenac (10 $\mu$ M) und des kompetitiven NOS-Hemmers N<sup>o</sup>-Nitro-L-Arginin (300 $\mu$ M) in das Organbad. Mit diesen Substanzen wurden die Gefäßringe nun über mindestens 30min inkubiert. Nach gegebenenfalls erfolgter Zugabe weiterer Inhibitoren wurden Dosis-Wirkungskurven nach Vorkontraktion mit dem Thromboxananalogon U46619 erstellt. Nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsplateaus von etwa 70-90% der dritten, maximalen kaliuminduzierten Kontraktion erfolgte hierfür die Zugabe kumulativ steigender Dosen von Bradykinin (0,1nmol/l – 1mmol/l) in das Organbad, wobei die nächsthöhere Dosis jeweils im Umschlagspunkt der Kurve appliziert werden sollte.



**Abbildung 4:** Foto eines Organbades mit Kraftaufnehmer. Man sieht einen auf zwei Stahlhaken gespannten Arterienring in 10ml Carbogen-begaster Krebs-Henseleit-Lösung. Der untere Haken ist fixiert, der obere mit dem Kraftaufnehmer verbunden. So war eine isometrische Kraftmessung möglich.

### 2.3 Membranpotentialmessungen von RCA-Segmenten

Nach der üblichen Arterienpräparation (siehe 2.1) wurden endothelintakte Segmente von rechten Schweinekoronararterien vorsichtig der Länge nach eröffnet, auf einen Sylgard-Boden eines beheizten Bades mit der Intima nach oben befestigt und dann mit einer temperierten HEPES-Tyrode (37°C) der folgenden Zusammensetzung (mmol/l) umspült (5ml/min): NaCl 140; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 1,3; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 10; Glukose 5 (pH 7,4 mit NaOH). Das Membranpotential wurde mit Glaskapillar-Mikroelektroden (Spitzenwiderstand von 80 bis 120MΩ) aufgenommen, die mit KCl (3mol/l) gefüllt und an einen Hoch-Impedanz-Verstärker (Intra 767, WPI) angeschlossen waren. Das Anstechen ("Impalement") der glatten Gefäßmuskulatur wurde von der intimalen Seite her vorgenommen. Ein erfolgreiches "Impalement" zeigte sich durch einen plötzlichen negativen Sprung des gemessenen Potentials von der Basislinie herab (Null-Abgleich), welcher durch ein stabiles negatives Potential begleitet wurde und mindestens 3min anhielt. Die Zugabe von Bradykinin in das Bad erfolgte mittels Bolusapplikation, um die benötigten Konzentrationen zu erreichen. Sämtliche Experimente wurden in der Anwesenheit von N<sup>0</sup>-Nitro-L-Arginin (300μmol/l), Diclofenac (10μmol/l) und U46619 (1μmol/l) durchgeführt.

### 2.4 Zellisolierung und Zellkultivierung

Die für die Western Blot Analysen verwendeten menschlichen endothelialen Nabelschnurvenenzellen (HUVEC) sowie Endothelzellen von Schweinekoronararterien wurden wie beschrieben (Popp *et al.*, 1996) isoliert und in M-199-Medium mit 20% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (Greiner) und 50U/min Penicillin, Streptomycin (50μg/ml) und L-Glutamin (1mM) auf Quarz-Deckgläsern oder 35mm Kulturschalen kultiviert.

## 2.5 Western Blot Analysen

Nach Inkubation der HUVEC mit den entsprechenden Substanzen ( $\Delta^9$ THC, HU210, PD98059, U0126) wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und darauf in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte die Lysis der Zellen durch die Zugabe eines Puffers der folgenden Zusammensetzung (mmol/l): Tris/HCl 50; NaCl 150; Natriumpyrophosphat 10; Natriumfluorid 25; EDTA 2; EGTA 2; Orthovanadat 2; Protease-Inhibitoren-Mischung aus Trypsin-Inhibitor 10µg/ml; Leupeptin 2µg/ml; Pepstatin A 2µg/ml; Antipain 2µg/ml; Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 40µg/ml (pH 7,5; 1% Triton X-100). Nun wurden die Zellen mit einem Spatel vom Boden gelöst, in Eppendorfhütchen gegeben und nach zehnmütiger Inkubation auf Eis 10min bei 13000U/min mittels Zentrifugation sedimentiert. Nach dem Zentrifugieren schloss sich eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) aus dem Triton X-100 löslichen Überstand an, danach wurde der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei 70°C aufbewahrt.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proben dann für 5min bei 95°C in Probenpuffer erhitzt (2% SDS (Natriumduodecylsulfat); 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol; 10%Glycerin; 0,001% Bromphenolblau; 63mM Tris-HCl (pH 6,8) ), bei 5000g für eine Minute zentrifugiert und anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel bestehend aus 6%igem Sammelgel und 12%igem Trenngel aufgetragen. Nun erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei einer Stromstärke von 60mA über eine Stunde. Der Laufpuffer bestand aus 192mM Glycin, 3,6mM SDS und 25mM Tris-HCl. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Biorad). Der ca. 60-minütige Transfer fand in einem Transferpuffer (160mM Glycin; 25mM Tris-HCl und 20% Methanol) bei einer Spannung von 150V und einer maximalen Stromstärke von 250mA statt. Die Nitrocelluloseblots wurden nun zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend 30sec in 0,2% Ponceau S-Lösung gefärbt. Nach Entfernen des ungebundenen Farbstoffs mit Wasser konnte anhand der Intensität der Proteinfärbung der Erfolg des Transfers sowie die gleichmäßige Beladung des Gels überprüft werden. Nach Entfärben der Nitrocellulose-Blots in Puffer A (Tween 20 0,05%; NaCl 20mM; Tris-HCl 50mM (pH7,4) ) wurden nun die unspezifischen Proteinbindungsstellen über eine Stunde mit 3%igem Rinderserumalbumin geblockt (Puffer B; enthält ferner 0,05% Tween 20, 20mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7,4) ). Bei 4°C erfolgte daraufhin die 12-stündige Inkubation der Blots mit einem spezifischen, polyklonalen Antikörper (1:1000 in Puffer B; Kaninchen) gegen die aktivierten, phosphorylierten mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) ERK1/2 (New England Biolabs) bzw. einem monoklonalen Antikörper gegen



das Connexin 43-Protein (Cx43). Anschließend wurden die Blots fünfmal mit Puffer A und nachfolgend zweimal mit Puffer C (20mM NaCl, 50mM Tris-HCl, (pH 7,5) ) gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Nach erneuter Inkubation in Puffer B wurden die Blots für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten, polyklonalen Antikörper (1:10000 in Puffer B, Ziege), der sich gegen die konstante Region Fc von  $\gamma$ -Immunglobulinen des Kaninchens richtet, inkubiert. Der ungebundene Antikörper wurde durch Waschen (s.o.) entfernt und anschließend die Peroxidase-katalysierte Chemiluminiszenz-Reaktion gestartet (ECL, Amersham-Buchler, Deutschland). Nach Auflegen eines Röntgenfilms (Fuji RX-Film; Du Pont de Nemours) konnten die ERK1/2 bzw. p-ERK1/2-Banden sowie die Cx43-Banden als lokale Schwärzungen des Films detektiert werden.

## **2.6 Radioaktive metabolische Darstellung des phosphorylierten gap junction-Proteins Connexin 43**

Die hierfür benötigten Endothelzellen wurden in phosphatfreier Tyrode-Lösung der folgenden Zusammensetzung gewaschen (in mM): NaCl 140; KCl 4,7;  $\text{CaCl}_2$  1,3;  $\text{MgCl}_2$  1; HEPES 10; Glukose 5 (pH 7,4 mit NaOH) und anschließend mit radioaktiver Phosphorsäure über acht bis zehn Stunden inkubiert ( $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4$ ; 30 $\mu\text{M}$ ; 0,125mCi/ml). Der Stimulation folgend wurden die Zellen zweimal gewaschen und in Immunoblotting-Lysispuffer (Zusammensetzung siehe 2.4) lysiert. Das Connexin 43-Protein wurde nach Zentrifugation vom Überstand (10min; 10000g) mit 4 $\mu\text{g}$  polyklonalem anti-Connexin-43-Antikörper immunpräzipitiert und der Antigen-Antikörper-Komplex mit Pansorbin (50 $\mu\text{l}$ ) gefällt (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland). Nun wurde der Antikörper/Pansorbin Niederschlag in SDS-Probenpuffer gekocht und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf SDS-Laufpuffer übertragen und auf PVDF-Membranen transferiert. Nach mehreren Waschrufen wurde  $^{32}\text{P}$ -markiertes Connexin 43 durch Autoradiographie dargestellt, anschließend erfolgte die Connexin-Protein-Darstellung mittels Western Blot Analysen mit einem monoklonalen Connexin 43-Antikörper.

## 2.7 Statistik

Die Angabe sämtlicher Werte erfolgte als Mittelwert  $\pm$  des Standardfehlers der Standardabweichung (SEM = standard error of the mean). n bedeutet die Anzahl der unabhängigen einzelnen Versuchsansätze bzw. der einzelnen Herzen, aus denen die im Versuch benötigten Arterien gewonnen wurden. Die Registrierung von Kontraktion und Relaxation der Gefäße erfolgte im Organbadversuch anhand von Veränderungen der Vorspannung in Gramm. Das Relaxationsverhalten nach Gabe eines Vasodilatators wurde prozentual zur maximalen Vorkontraktion mittels des Vasokonstriktors U46619 angegeben, die Kontraktion durch kontrahierend wirkende Agonisten wurde immer in Relation zur maximalen Vorkontraktion mit Kaliumchlorid gesetzt. Für die einzelnen Dosiswirkungskurven wurden getrennt die Konzentrationen des Vasodilatators berechnet, unter denen es zu einer halbmaximalen Relaxation gekommen war ( $EC_{50}$ ). Wenn bei einer Dosis-Wirkungskurve die Berechnung einer  $EC_{50}$  nicht möglich war, erfolgte die Ermittlung der maximalen Relaxation  $R_{max}$ . Berechnungen sowie graphische Darstellungen wurden mit dem Software Programm Graph Pad Prism 3.0 durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Students' t-test für paarige sowie unpaarige Stichproben, einer einseitigen oder zweiseitigen Varianzanalyse (ANOVA), an die sich dann ein Bonferroni-Test anschloss. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $*p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant, eine Wahrscheinlichkeit von  $**p < 0,01$  als hochsignifikant eingeschätzt.

## 2.8 Substanzen

Bradykinin kam von Bachem Biochemica GmbH (Heidelberg, Deutschland) und wurde in Wasser gelöst. Die MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 wurden von Calbiochem-Novabiochem (Bad-Soden, Deutschland) bezogen und in DMSO gelöst (Stammlösung PD98059: 25mM; U0126: 2,5mM). Die gap junction-Inhibitoren  $18\alpha$ -Glycyrrhetinsäure ( $18\alpha$ -GA) und  $18\beta$ -Glycyrrhetinsäure ( $18\beta$ -GA) kamen von Sigma Chemical Co (Deisenhofen, Deutschland) und wurden in DMSO gelöst (Stammlösung jeweils 10mM). Carboxolol, ebenfalls von Sigma, löste sich in Ethanol (96%) (Stammlösung 100mM).  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol kam von RBI (Research Biochemicals International), gelöst in Ethanol (96%) (Stammlösung 31,8mM). Der monoklonale Connexin 43-(Cx43)-Antikörper wurde von Transduction Laboratories (Lexington, Kentucky) bezogen, die Phospho-ERK1/2

(Thr202/Tyr204 erkennend) sowie die ERK1/2-Antikörper kamen von New England Biolabs Inc. (Beverly, Maine). Das M-199 Medium wurde von GIBCO (Berlin, Deutschland) bezogen. Es wurden HU210 (3-(1,1-Dimethylethyl)-(-)-11-Hydroxy- $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol) von Biotrend (Köln, Deutschland) und U46619 (9,11-Dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Epoxymethanoprostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> ) von Alexis Biochemicals (Grünberg, Deutschland) verwendet. Ethylendiamintetraessigsäure Dinatrium-Calciumsalz (Tritiplex®) wurde von Merck (Darmstadt, Deutschland), N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES) von Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Alle weiteren Substanzen kamen von Sigma und wurden in Wasser oder Puffer gelöst: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-Arginin, Diclofenac, Cromakalim, Dideoxyadenosin, Penicillin, Streptomycin, L-Glutamin.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Cannabinoiden auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation von Schweinekoronararterien

Aus Voruntersuchungen (Fleming *et al.*, 1999) war bekannt, dass der endogene Ligand am CB<sub>1</sub>-Cannabinoidrezeptor Arachidonylethanolamid (=Anandamid) die COX- und NOS-unabhängige, EDHF-vermittelte Relaxation hemmt. Es wurde daher zunächst untersucht, ob dieser Effekt auch bei anderen CB<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten zu beobachten ist, um den möglichen zugrunde liegenden Signaltransduktionsweg charakterisieren zu können.

An der isolierten Koronararterie des Schweins hemmte  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (30  $\mu$ M) die EDHF-vermittelte Relaxation auf Bradykinin (Abb. 5) ( $R_{max}$ : THC 33,27  $\pm$  13,52; Kontrolle 90,95  $\pm$  3,27; \* $p$ <0,05), während die Endothel-unabhängige Relaxation auf den selektiven Kaliumkanalöffner Cromakalim nicht beeinflusst wurde (Abb. 6).

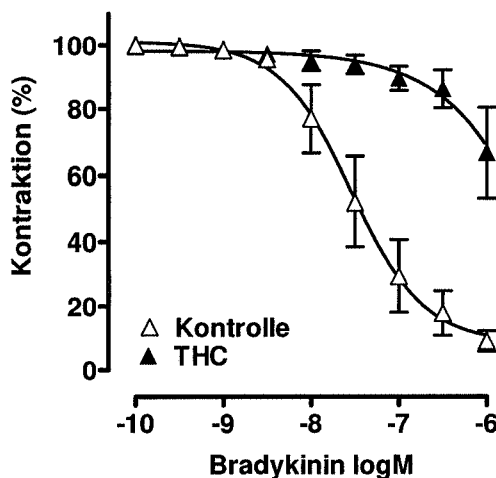


Abbildung 5: Effekt von  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC; 30  $\mu$ M) auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien. Dosis-Wirkungskurven nach Gabe von Bradykinin in U44619-vorkontrahierten Koronararterien in Anwesenheit von Diclofenac (10  $\mu$ M) und Nitro-L-Arginin (300  $\mu$ M) in An- und Abwesenheit von THC.  $n=6$ ,  $p<0,05$ .

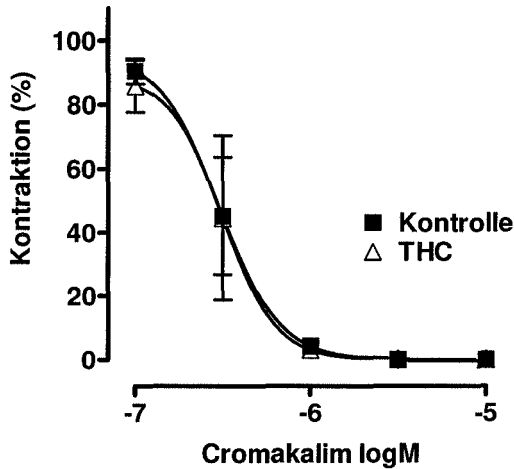


Abbildung 6: Effekt von  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC; 30 $\mu$ M) auf die Endothel-unabhängige Relaxation durch den selektiven Kaliumkanalöffner Cromakalim. Dosis-Wirkungskurven nach Gabe des ATP-abhängigen Kaliumkanalöffners Cromakalim (100nM-10 $\mu$ M) in An- und Abwesenheit von THC. n=9, p=nicht signifikant.

### 3.2 Effekte einer Hemmung von ERK1/2 auf die Cannabinoid-induzierte Hemmung EDHF-vermittelter Gefäßprozesse

Da bereits gezeigt wurde, dass Cannabinoide in der Lage sind die extrazellulär regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) zu aktivieren (Bouaboula *et al.*, 1996; Wartmann *et al.*, 1995), wurde nun der Einfluss von Hemmstoffen der MAP-Kinase-Aktivierung (MEK-Inhibitoren; hier PD98059 und U0126) auf die Cannabinoid-induzierte Hemmung der EDHF-Antwort untersucht.

Sowohl PD98059 (50 $\mu$ M) als auch U0126 (10 $\mu$ M) führten zu einer Blockierung der THC-vermittelten Hemmung der EDHF-Relaxation (Abb.7). Zusätzlich führten beide Substanzen zu einer leichten Desensibilisierung gegen den Vasokonstriktor U46619 (Abb.8) und zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve der EDHF-vermittelten Relaxation in Kontrollgefäßen (Abb. 9). Die Gesamtantwort der endothelabhängigen Relaxation nach Gabe von Bradykinin in Abwesenheit eines NO-Synthase-Hemmstoffs wurde hingegen nicht beeinflusst (Abb.10).

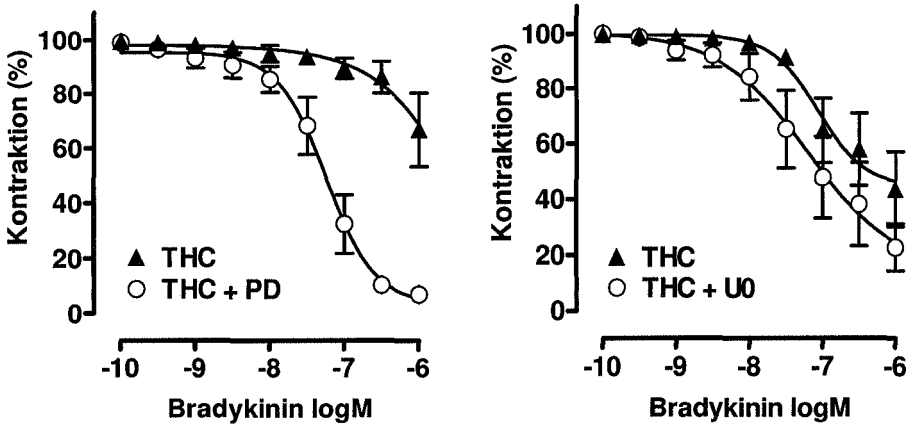


Abbildung 7: Einfluss der MEK-Inhibitoren PD98059 (PD; 50 $\mu$ M) und U0126 (UO; 10 $\mu$ M) auf die Cannabinoid-induzierte Hemmung der EDHF-vermittelten Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien. Dosis-Wirkungskurven nach Gabe von Bradykinin in U46619-vorkontrahierten Koronararterien in Anwesenheit von Diclofenac (10 $\mu$ M), Nitro-L-Arginin (300 $\mu$ M) und THC (30 $\mu$ M). n=6, p<0,05. (Rmax: THC: 33,26  $\pm$  13,52; THC+PD: 93,64  $\pm$  2,02; bzw. Rmax THC: 56,6  $\pm$  13,46; THC+UO: 77,36  $\pm$  8,41) n=6, p<0,05

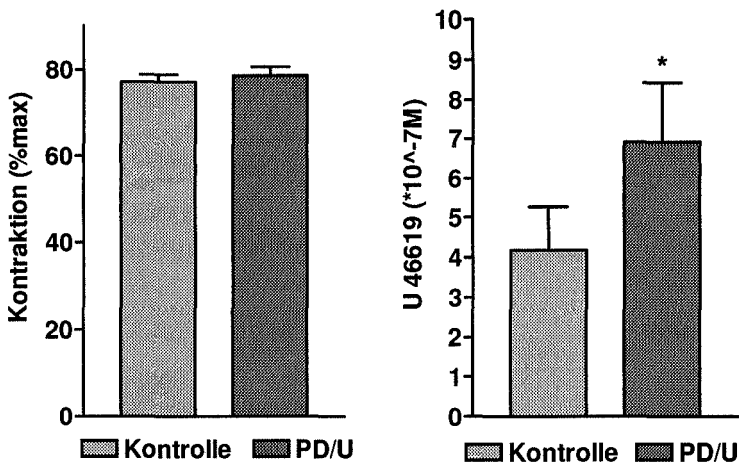
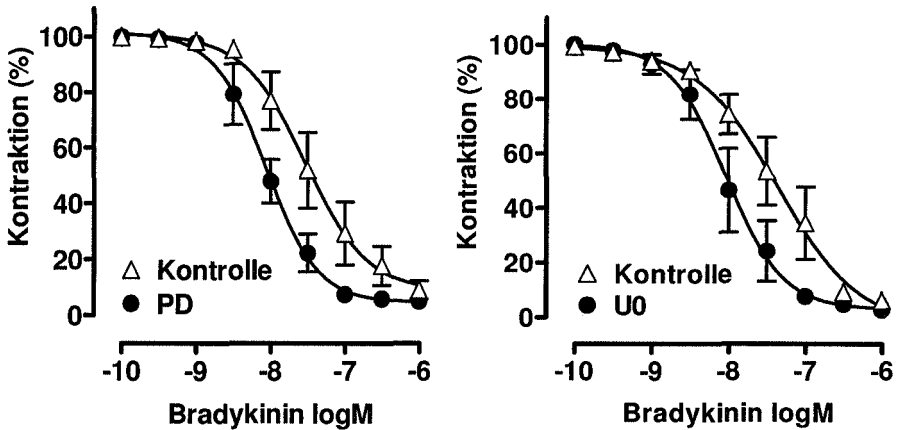
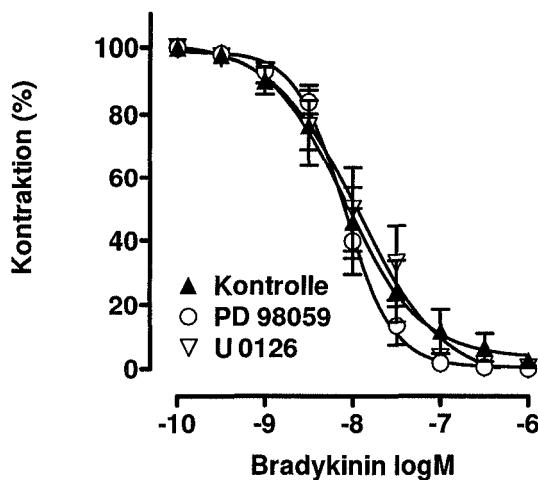


Abbildung 8: Desensibilisierung von PCA gegen den Vasokonstriktor U46619 durch die MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126. Für eine Kontraktion von 80%max (links) benötigtes U46619 nach Inkubation mit PD98059 (PD; 50 $\mu$ M) oder U0126 (U0126; 10 $\mu$ M). (Kontrolle 4,182  $\pm$  1,09; PD/U 6,909  $\pm$  1,52) \*p<0,05; n=11.



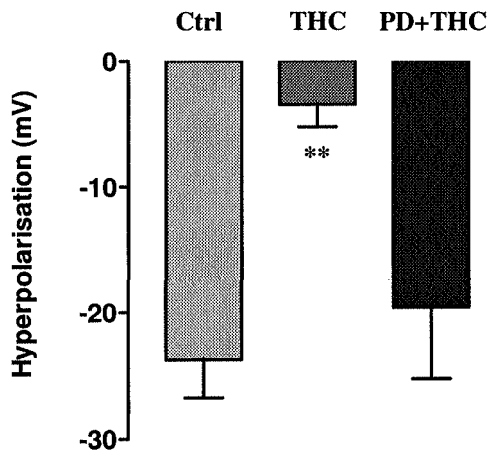
**Abbildung 9:** Einfluss der MEK-Inhibitoren PD98059 (PD; 50 $\mu$ M) und U0126 (U0; 10 $\mu$ M) auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien. Dosis-Wirkungskurven auf Bradykinin in U44619-vorkontrahierten Koronararterien in Anwesenheit von Diclofenac (10 $\mu$ M) und Nitro-L-Arginin (300 $\mu$ M). (linke Grafik: (logEC<sub>50</sub> Werte) Kontrolle: -7,40  $\pm$  0,24; PD98059: -8,09  $\pm$  0,15 ( $p < 0,01$ ), rechte Grafik: Kontrolle: -7,40  $\pm$  0,21 U0126: -8,00  $\pm$  0,20 ( $p < 0,1$ ))



**Abbildung 10:** Einfluss der MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 auf die NO-abhängige Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien. Dosis-Wirkungskurven nach Gabe von Bradykinin in U44619-vorkontrahierten Koronararterien in Anwesenheit von Diclofenac (10 $\mu$ M) und Abwesenheit eines NO-Synthasehemmers; ((logEC<sub>50</sub> Werte) Kontrolle: -7,91  $\pm$  0,23; PD: -8,05  $\pm$  0,11; U -7,91  $\pm$  0,21) n=10, p=nicht signifikant.

### 3.3 Einfluss von $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol und PD98059 auf die EDHF-vermittelte Hyperpolarisation von Schweinekoronararterien

Da die Wirkung von EDHF auf der endothelvermittelten Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen beruht, wurde der Effekt von THC und dem Hemmer der MAP-Kinase-Aktivierung PD98059 auf die Bradykinin-induzierte Änderung des Membranpotentials in der Muskularis der Schweinekoronararterien untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Abnahme der Hyperpolarisation in Anwesenheit des Cannabinoids  $\Delta^9$ -THC ( $-3,48 \pm 1,79$  mV) gegenüber der Kontrolle ( $23,75 \pm 3,00$  mV). In Anwesenheit von PD98059 wurde der hyperpolarisationshemmende Effekt von  $\Delta^9$ -THC aufgehoben ( $19,57 \pm 5,63$  mV).



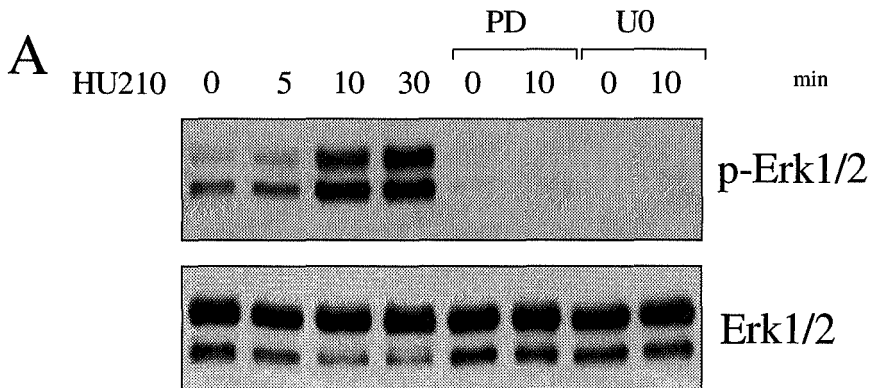
**Abbildung 11:** Effekt von  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC;  $10\mu\text{M}$ ) und PD98059 (PD;  $50\mu\text{M}$ ) auf die Bradykinin-induzierte, EDHF-vermittelte Hyperpolarisation. Membranpotential-Registrierungen an Schweinekoronarsegmenten mittels Glaskapillar-Mikroelektroden in Anwesenheit von U46619 ( $0,1\mu\text{M}$ ), Diclofenac ( $10\mu\text{M}$ ) und L-NA ( $300\mu\text{M}$ ). \*\* $p < 0.01$ ,  $n > 5$



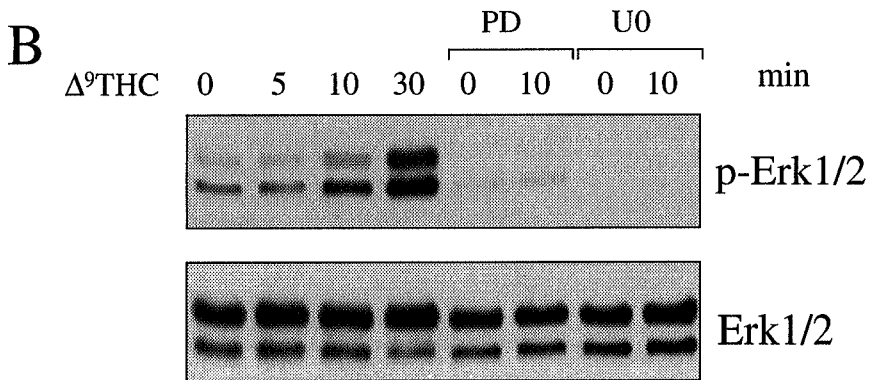
### 3.4 Einfluss von Cannabinoiden auf die Phosphorylierung von ERK1/2

Da die hemmenden Effekte von THC auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation und Hyperpolarisation jeweils durch Hemmstoffe der MAP-Kinase-Aktivierung blockiert werden konnten, wurde nun mittels Western Blot Analysen untersucht, ob eine Inkubation mit Cannabinoiden in Endothelzellen zu einer Änderung des Phosphorylierungszustands und damit des Aktivitätszustands von ERK1/2 führt.

$\Delta^9$ -THC (Abb.12B) und auch der selektive Cannabinoidrezeptoragonist HU210 (Abb.12A) erhöhten dabei passager die ERK1/2-Phosphorylierung. Eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 war bereits fünf Minuten nach Zugabe von  $\Delta^9$ -THC sowie HU210 zu beobachten, erreichte nach ca. 30 Minuten ihr Maximum und kehrte nach etwa einer Stunde wieder auf ein Kontrollniveau zurück. Ferner war zu beobachten, dass diese Cannabinoid-induzierte Aktivierung der ERK1/2 MAP-Kinasen durch Zugabe von PD98059 sowie U0126 vollständig verhindert werden konnte.



**Abbildung 12A:** Effekt des selektiven Cannabinoidrezeptoragonisten HU210 auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in An- und Abwesenheit der Hemmstoffe der MAP-Kinase-Aktivierung PD98059 (PD; 50 $\mu$ M) und U0126 (U0; 20 $\mu$ M). Western Blot Analyse auf ERK1/2 und phospho-ERK1/2.



**Abbildung 12B:** Effekt von  $\Delta^9$ -THC auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in An- und Abwesenheit der Hemmstoffe der MAP-Kinase-Aktivierung PD98059 (PD; 50 $\mu$ M) und U0126 (U0; 20 $\mu$ M). Western Blot Analyse auf ERK1/2 und phospho-ERK1/2.

### 3.5 Effekt von $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol auf die Connexin-Phosphorylierung in menschlichen Endothelzellen

Als ein möglicher zellulärer Angriffspunkt, über den Cannabinoide die nachgewiesene Hemmung der EDHF-vermittelten Gefäßrelaxation und Hyperpolarisation bewirken, sollten nun gap junctions näher untersucht werden. Die Offenwahrscheinlichkeit von gap junctions wird durch spezifische Phosphorylierung der Connexin-Proteine gesteuert, aus welchen die einzelnen gap junctions zusammengesetzt sind. Mit Western Blot Analysen und Radiophosphatmarkierung wurde nun der Phosphorylierungszustand von Connexin 43 (Cx43), des vorherrschenden Connexins in menschlichen Endothelzellen, unter dem Einfluss von  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol untersucht.

In der Autoradiographie konnte gezeigt werden, dass  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC; 1 $\mu$ M) in den Endothelzellen nach 15 Minuten zu einer deutlichen Zunahme der  $^{32}$ P-Inkorporation in das Connexin 43-Protein führt, sowie eine deutliche Zunahme der phosphorylierten (P1/P2) Connexin 43-Fraktionen im SDS-Polyacrylamidgel bewirkt. Die Phosphorylierung von Cx43 wurde durch die vorherige Inkubation der Endothelzellen mit dem Hemmstoff der MAP-Kinase-Aktivierung PD98059 fast vollständig verhindert, was darauf hindeutet, dass die  $\Delta^9$ -THC-induzierte Cx43-Phosphorylierung durch eine Aktivierung von ERK1/2 vermittelt wird.

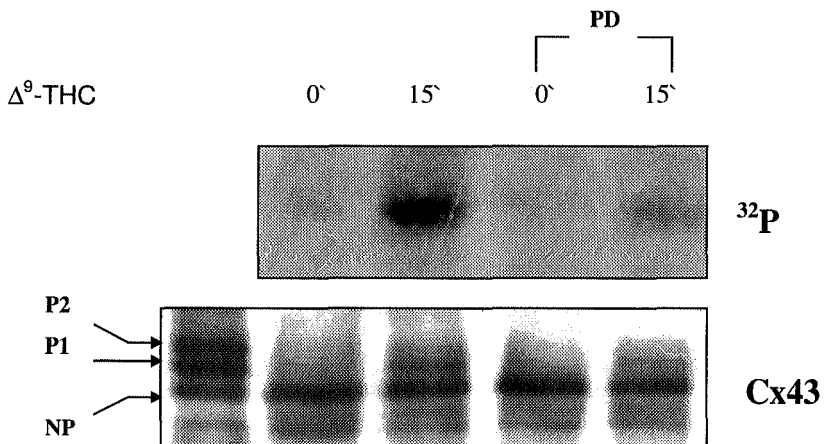
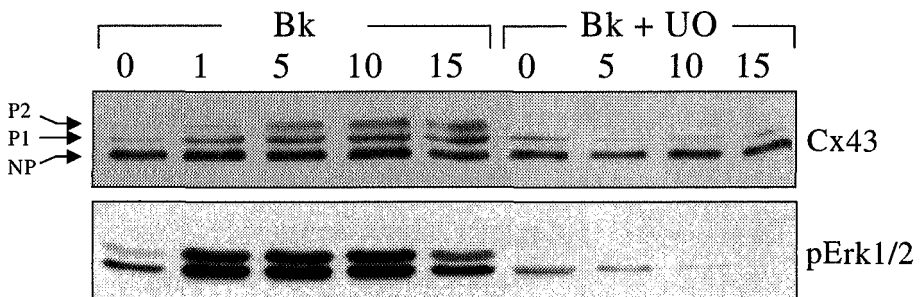


Abbildung 13: Effekt von  $\Delta^9$ -THC auf die Phosphorylierung des gap junction-Proteins Connexin 43 (Cx43) in An- und Abwesenheit von PD98059 (PD; 50 $\mu$ M). Autoradiographie (obere Grafik) von Cx43-Immunpräzipitaten und Western Blot Analyse (untere Grafik).

### 3.6 Effekt von Bradykinin und 11,12-Epoxyeicosatriensäure auf die Phosphorylierung von Connexin 43 und ERK1/2

Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass Bradykinin in Endothelzellen ein starker Aktivator der MAP-Kinasen ist (Fleming *et al.*, 1995). Daher wurde nun untersucht, ob Bradykinin in der Lage ist, in menschlichen Endothelzellen über eine Aktivierung der MAP-Kinasen zu einer Änderung des Phosphorylierungszustands von Cx43 zu führen, was die Rolle der MAP-Kinasen an einer Modulation der gap junctions untermauern würde.

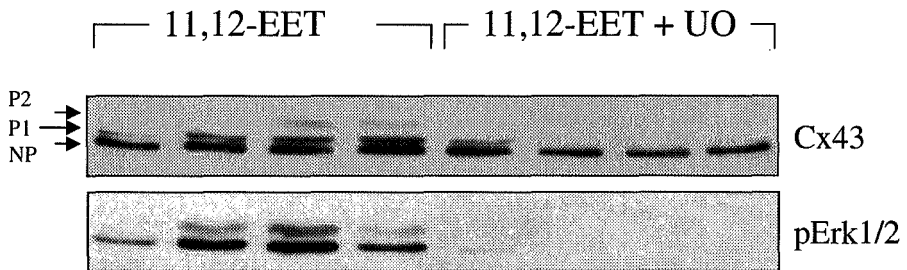
Nach der Inkubation mit Bradykinin (1 $\mu$ M) war eine deutliche Zunahme der Cx43-Phosphorylierung sowie der Phosphorylierung von ERK1/2 zu beobachten. Dies hatte nach etwa zehn Minuten seine größte Ausprägung. Durch die Zugabe des Hemmstoffs der MAP-Kinase-Aktivierung U0126 (U0; 10 $\mu$ M) konnte die Bradykinin-induzierte Phosphorylierung von Cx43 sowie ERK1/2 annähernd vollständig verhindert werden.



**Abbildung 14A:** Effekt von Bradykinin (Bk; 1 $\mu$ M) auf die Phosphorylierung des gap junction-Proteins Connexin 43 (Cx43) bzw. ERK1/2 in An- und Abwesenheit des Hemmstoffs der MAP-Kinase-Aktivierung U0126 (U0; 10  $\mu$ M). Western Blot Analysen unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen Connexin 43 (Cx43) und phospho-ERK1/2.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde nun geprüft, ob das Cytochrom-P450-Derivat der Arachidonsäure, 11,12-Epoxyeicosatriensäure (11,12-EET), für welches angenommen wird, es könne sich um EDHF handeln, ebenfalls einen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 bzw. Connexin 43 hat.

Es ließ sich eine deutliche durch 11,12-EET induzierte Zunahme der phosphorylierten Cx43- sowie ERK1/2-Fraktion verzeichnen. Diese gesteigerte Phosphorylierung hatte nach fünf Minuten ihre stärkste Ausprägung und nahm danach wieder leicht ab. Durch die Zugabe des Hemmstoffs der MAP-Kinase Aktivierung U0126 (10 $\mu$ M) konnte die durch 11,12-EET induzierte Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2 und die durch sie vermittelte Phosphorylierung des gap junction-Proteins Connexin 43 fast vollständig verhindert werden.



**Abbildung 14A:** Effekt von 11,12 Epoxyeicosatriensäure (11,12 EET; 1 $\mu$ M) auf die Phosphorylierung des gap junction Proteins Connexin 43 (Cx43) bzw. ERK1/2 in An- und Abwesenheit von U0126 (U0; 10 $\mu$ M). Western Blot Analysen unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen Connexin 43 (Cx43) und phospho-ERK1/2.

### 3.7 Einfluss von Hemmstoffen der gap junctions auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien

Aufgrund der Erkenntnisse, dass Cannabinoide die EDHF-vermittelte Relaxation und Hyperpolarisation hemmen und zudem über eine Aktivierung der MAP-Kinasen zu einer Phosphorylierung des Connexin 43 Proteins führen, wurde nun im Organbad untersucht, ob die klassischen gap junction-Hemmer  $18\alpha$ -Glycyrrhetinsäure ( $18\alpha$ -GA;  $100\mu\text{M}$ ),  $18\beta$ -Glycyrrhetinsäure ( $18\beta$ -GA,  $10\mu\text{M}$ ) sowie Carbenoxolon ( $100\mu\text{M}$ ) einen Einfluss auf die Mechanismen der EDHF-vermittelten Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien zeigen.

Analog zu Ergebnissen früherer Studien (Beny & Schaad, 2000) konnte in den Organbad-untersuchungen sowohl für die Derivate der Glycyrrhetinsäure  $18\alpha$ -GA und  $18\beta$ -GA als auch für Carbenoxolon kein hemmender Effekt auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation, ausgelöst durch Bradykinin, in Schweinekoronarien nachgewiesen werden (Abb 15A-C).

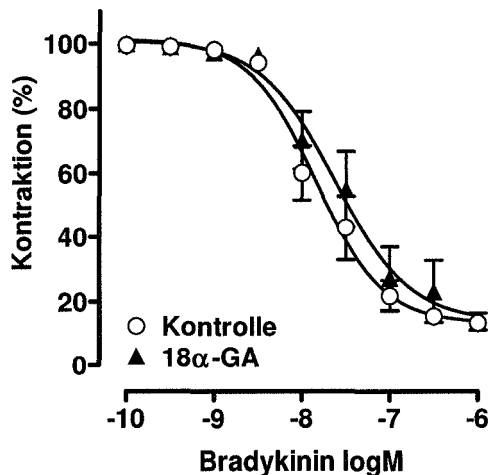
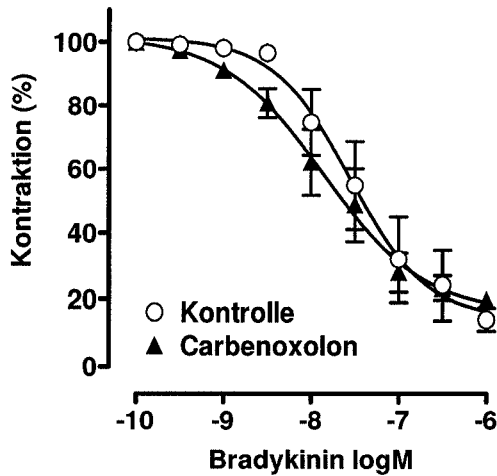
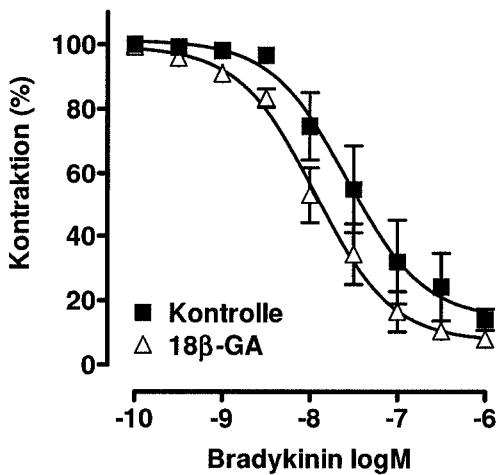


Abbildung 15A: Effekt des gap junction-Inhibitors  $18\alpha$ -Glycyrrhetinsäure ( $18\alpha$ -GA,  $100\mu\text{M}$ ) auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien. Dosis-Wirkungskurven nach Gabe von Bradykinin in U44619-vorkontrahierten Koronararterien in Anwesenheit von Diclofenac ( $10\mu\text{M}$ ) und Nitro-L-Arginin ( $300\mu\text{M}$ ).  $n=8$ ,  $p$ =nicht signifikant.



**Abbildung 15B:** Effekt des gap junction-Inhibitors Carbenoxolon (100 $\mu$ M) auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien. Dosis-Wirkungskurven nach Gabe von Bradykinin in U44619-vorkontrahierten Koronararterien in Anwesenheit von Diclofenac (10 $\mu$ M) und Nitro-L-Arginin (300 $\mu$ M). n=5, p=nicht signifikant.

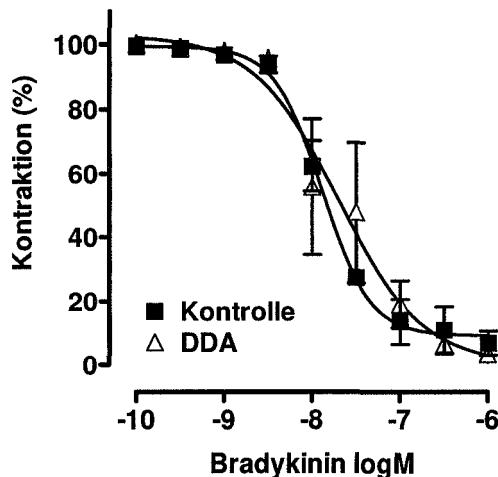


**Abbildung 15C:** Effekt des gap junction-Inhibitors 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure (18 $\beta$ -GA, 10 $\mu$ M) auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien. Dosis-Wirkungskurven nach Gabe von Bradykinin in U44619-vorkontrahierten Koronararterien in Anwesenheit von Diclofenac (10 $\mu$ M) und Nitro-L-Arginin (300 $\mu$ M). n=5, p=nicht signifikant.

### 3.8 Effekt des Adenylzyklase-Inhibitors 2'5'-Dideoxyadenosin auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien

Von Cannabinoiden ist bekannt, dass sie zu einer Hemmung der Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führen. Mit dem Hemmer der Adenylzyklase 2'5'-Dideoxyadenosin (DDA) wurde nun untersucht, ob ein zellulärer Abfall an cAMP die Hemmung EDHF-vermittelter Relaxation und Hyperpolarisation erklären kann.

Mit Hilfe der Organbaduntersuchungen konnte kein Einfluss von DDA auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation in Schweinekoronarien festgestellt werden.



**Abbildung 16:** Effekt von 2'5'-Dideoxyadenosin (DDA; 30µM) auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien. Dosis-Wirkungskurven nach Gabe von Bradykinin in U44619-vorkontrahierten Koronararterien in Anwesenheit von Diclofenac (10µM) und Nitro-L-Arginin (300µM). n=3; p=nicht signifikant



## 4. Diskussion

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen geht hervor, dass Cannabinoide potente Hemmstoffe der NO- und COX-unabhängigen, EDHF-vermittelten Hyperpolarisation und Gefäßrelaxation in Schweineherzkranzarterien sind. Daneben aktivieren Cannabinoide die extrazellulär regulierten Proteinkinasen ERK1/2, welche wiederum für die Phosphorylierung des gap junction-Proteins Connexin 43 und eine damit verbundene Entkopplung der Zell-zu-Zell-Kommunikation zwischen den Endothelzellen verantwortlich gemacht werden konnten. In Versuchen mit Hemmstoffen der MAP-Kinase-Aktivierung PD98059 und U0126 stellte sich heraus, dass diese Substanzen die Cannabinoid-induzierte Hemmung der EDHF-vermittelten Gefäßrelaxation komplett aufheben konnten. Zudem führten die MEK-Inhibitoren in Abwesenheit des Cannabinoids zu einer Verstärkung der Relaxation im Vergleich zu Kontrollgefäßen. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die molekularen Mechanismen, die der Cannabinoid-induzierten Hemmung von EDHF-vermittelten Gefäßrelaxationen zugrunde liegen, zentral durch ERK1/2 gesteuert werden.

### 4.1 Effekt von Agonisten des CB<sub>1</sub>-Cannabinoidrezeptors auf die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation

Cannabinoide, die biochemisch aktiven Bestandteile von Marihuana, besitzen über ihre Wirkung am zentralen CB<sub>1</sub>-Rezeptor psychoaktive Eigenschaften. Zudem konnte gezeigt werden, dass Cannabinoide, insbesondere  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC) sowie das endogene Cannabinoid Arachidonylethanolamid (Anandamid), über periphere Rezeptoren zahlreiche somatische Funktionen beeinflussen und unter anderem auch Effekte auf das kardiovaskuläre System haben. Sowohl THC (Vollmer *et al.* 1974) als auch Anandamid (Varga *et al.*, 1995) senken den Blutdruck und die Herzfrequenz. Diese Effekte sind einerseits Konsequenz einer zentralen CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Aktivierung, andererseits Folge direkter dilatatorischer Effekte auf die Gefäßmuskulzellen, die über Endothel-abhängige und unabhängige Mechanismen vermittelt werden (Hillard, 2000). Über die molekularen Mechanismen, die der Cannabinoid-induzierten Vasodilatation zugrunde liegen, herrscht bis heute keine vollständige Klarheit. Bislang wurden zwei Cannabinoid-Rezeptoren, der CB<sub>1</sub>- und CB<sub>2</sub>-Rezeptor, identifiziert und geklont. In verschiedenen Studien mit dem selektiven CB<sub>1</sub>-Antagonisten SR141716A wurde die Relaxation isolierter Gefäße der Aktivierung

endothelialer CB-Rezeptoren zugeschrieben. So konnte z.B. für das endogene Cannabinoid Anandamid eine Relaxation in den afferenten juxtamedullären Arteriolen in der Niere der Ratte nachgewiesen werden, die über den CB<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt wird und über eine endotheliale NO-Freisetzung konsekutiv zu einer verminderten Sympathikusaktivität der Nervenendigungen in der Arteria renalis führt (Deutsch *et al.* 1997). Andere Studien bezweifeln hingegen eine direkte Beteiligung von CB<sub>1</sub>- und CB<sub>2</sub>-Rezeptoren an einer durch Anandamid hervorgerufenen Vasodilatation (Wagner *et al.*, 1999; Randall *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998). Für die Anandamid-induzierte Vasodilatation in Mesenterialgefäßen werden zwei verantwortliche Reaktionswege vorgeschlagen: einer über einen endothelialen SR141716A-sensitiven nicht-CB<sub>1</sub>-Anandamid-Rezeptor und ein anderer über einen direkten SR141716A-resistenten vasodilatierenden Effekt von Anandamid auf die glatte Gefäßmuskelzelle (Wagner *et al.*, 1999). Studien mit dem neurologisch und psychologisch nicht aktiven Cannabinoid „abnormales Cannabidiol“ (Abn-cbd) lassen die Existenz eines bislang unbekannten endothelialen SR141716A-sensitiven Rezeptors für Anandamid vermuten, der neben SR141716A auch durch Cannabidiol hemmbar ist. Die durch Abn-cbd hervorgerufenen Gefäßrelaxationen konnten jeweils durch die Kombination aus Charybdotoxin und Apamin gehemmt werden (Jarai *et al.* 1999). Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass Cannabinoide über endotheliale Rezeptoren möglicherweise die Freisetzung eines EDHF bewirken, der dann über Ca<sup>2+</sup>-aktivierte K<sub>Ca</sub><sup>+</sup>-Kanäle die Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle bewirkt (Jarai *et al.*, 1999). Andere Studien zeigten jedoch auf, dass endogene Cannabinoide im Endothel durch die Cyclooxygenase über Arachidonsäure zu vasoaktiven Prostaglandinen verstoffwechselt werden können (Ellis *et al.*, 1995; Pratt *et al.*, 1998; Fleming *et al.*, 1999). Ein hemmender Einfluss auf L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle konnte ebenfalls nachgewiesen werden. (Gebremedhin *et al.*, 1999).

Der vasodilatierenden Wirkung von Cannabinoiden steht der hemmende Einfluß der Substanzen auf die EDHF-vermittelte Relaxation gegenüber. So konnte an isolierten Arterien-segmenten von Kaninchen und Schwein gezeigt werden, dass Anandamid wie auch der selektive CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist HU210 die EDHF-vermittelte Relaxation hemmen (Fleming *et al.* 1999). Darüber hinaus gelang es in dieser Arbeit, die Hemmung der EDHF-vermittelten Relaxation und Hyperpolarisation auch für den CB<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten Δ<sup>9</sup>-Tetrahydrocannabinol nachzuweisen. Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch unklar. Es wurde vermutet, dass die Produktion von EDHF über eine Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors gehemmt werden könnte (Fleming *et al.*, 1999). Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die

endothelialen ERK1/2 MAP-Kinasen und interendotheliale sowie myoendotheliale gap junctions im Cannabinoid-Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle spielen.

#### **4.2 Effekt von Cannabinoiden auf die MAP-Kinasen ERK1/2**

Anhand von Untersuchungen an transfizierten Ovarialzellen des chinesischen Hamsters sowie an menschlichen diploiden WI-38-Fibroblasten wurde gezeigt, dass Cannabinoide in der Lage sind, die extrazellulär regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) zu aktivieren, die zur Familie der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) gehören (Bouaboula *et al.*, 1996; Wartmann *et al.*, 1995). Mit Hilfe von Western Blot Analysen gelang in der vorliegenden Arbeit der Nachweis, dass es in menschlichen Endothelzellen nach Inkubation mit den CB<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol sowie HU210 zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung und damit der Aktivität von ERK1/2 kommt. Dieser Effekt konnte durch die vorherige Inkubation mit Substanzen, die die MAP-Kinase-Kinase (MEK) und damit die Aktivierung der MAP-Kinasen wie u.a. ERK1/2 hemmen, vollständig blockiert werden. In unseren Versuchen waren dies PD98059 und U0126. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Cannabinoide in Endothelzellen über Phosphorylierungsprozesse zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen wie z.B. ERK1/2 führen.

#### **4.3 Effekt von CB<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten auf zelluläre Strukturen und Signaltransduktionswege**

Der zentrale CB<sub>1</sub>-Cannabinoidrezeptor konnte bislang mit einer Vielzahl an biologischen Effekten in Verbindung gebracht werden. So gilt als erwiesen, dass eine CB<sub>1</sub>-Aktivierung zu einer Hemmung der Adenylylzyklase mit konsekutiv erniedrigten Spiegeln an zyklischen Nukleotiden führt (Howlett *et al.*, 1985). Daneben haben CB<sub>1</sub>-Aktivatoren Modulationen zellulärer Ionenkanäle zur Folge (Mackie *et al.*, 1992). Neben den Ergebnissen dieser Arbeit, die eine Cannabinoid-induzierte Aktivierung der extrazellulär regulierten MAP-Kinasen ERK1/2 aufzeigen, führten frühere Untersuchungen bereits zu der Erkenntnis, dass in mit dem CB<sub>1</sub>-Rezeptor transfizierten Ovarialzellen die konstitutive Aktivität der MAP-Kinase erhöht war (Bouaboula *et al.*, 1997). Zudem führte eine Stimulation CB<sub>1</sub>-transfizierter Zellen mit Cannabinoiden zu einer Aktivierung des "intermediate early gen" Krox-24. Diese

Cannabinoideffekte werden durch ein Pertussistoxin-sensitives Guanin-Nucleotid-Bindungsprotein ( $G_i$ -Protein) vermittelt. Die erhöhten MAPK/Krox-24-Aktivitäten ließen sich in den Experimenten genauso wie die Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade durch Agonisten an Rezeptoren der Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie wie Insulin oder Insulin-like-growth-factor (IGF) (Luttrell, 1995) durch den selektiven  $CB_1$ -Rezeptorantagonisten SR141716A aufheben (Bouaboula *et al.*, 1997). Daneben beschreiben andere Studien die Hemmbarkeit einer Cannabinoid-induzierten Aktivierung der MAP-Kinase durch  $CB_1$ -Rezeptor-Antisense-Oligonucleotide (Liu *et al.*, 2000).

Wir konnten feststellen, dass  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC) und HU210 sowohl die elektrische Kommunikation als auch den Transfer des Farbstoffs Luciferyellow zwischen Endothelzellen hemmen, indem sie die Zell-zu-Zell-Kommunikation via gap junctions hemmen (im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgestellt, siehe Brandes *et al.*, 2002). In den Organbaduntersuchungen dieser Arbeit wurden weder die NO-vermittelte Vasorelaxation noch die durch den ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanal-Öffner Cromakalim vermittelte Relaxation durch  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC), PD98059 oder U0126 beeinflusst. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Cannabinoide spezifisch in EDHF-Signallingprozesse eingreifen müssen. Ein direkter Effekt der Cannabinoide via  $CB_1$ -Rezeptor auf den  $B_2$ -Kinin-Rezeptor der Endothelzelle scheint aufgrund der unveränderten NO-Antwort auf  $B_2$ -Agonisten wie Acetylcholin oder Bradykinin unwahrscheinlich. Zudem kann auch eine Hemmung der cAMP-Produktion als Konsequenz der  $CB_1$ -Aktivierung durch Cannabinoide (Howlett *et al.*, 1986; Bouaboula *et al.*, 1995/1996) nicht zur Erklärung der Cannabinoid-induzierten Änderungen der EDHF-Effekte herangezogen werden, da der Adenylylzyklase-Inhibitor 2'5'-Dideoxyadenosin in den Organbadexperimenten keinen Einfluss auf die EDHF-vermittelten Relaxationen hatte.

Das endogene Cannabinoid Anandamid ist in der Lage neben ERK1/2 die p38-MAP-Kinase sowie die c-Jun-Proteinkinase zu aktivieren (Liu *et al.*, 2000). In unserer Studie zeigten Hemmstoffe der Proteinkinase C sowie der p38-MAP-Kinase jedoch keinen Einfluss auf die Cannabinoid-induzierte Hemmung der Kommunikation via gap junctions (Brandes *et al.*, 2002), was eine direkte Beteiligung dieser Kinasen an den Cannabinoid-Effekten relativ unwahrscheinlich macht.

Mittlerweile wurde beschrieben, dass Cannabinoide in differenzierten Maus-Neuroblastomzellen über eine Tyrosin-Phosphorylierung zur Aktivierung einer "focal-adhesion-kinase-related-non-kinase" (FRNK) führen (Zhou *et al.*, 2002). Diese neu entdeckte, Cannabinoid-

induzierte FRNK-Tyrosin-Phosphorylierung könnte neue Ansätze in der Untersuchung Cannabinoid-induzierter Änderungen zellulärer Signallingprozesse ergeben.

#### 4.4 Rolle des CB<sub>1</sub>-Rezeptors

Da die hemmenden Effekte von THC auf gap junctions nur zu einem gewissen Teil durch den selektiven CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten SR141716A aufgehoben werden konnten (Brandes *et al.*, 2002), ist wahrscheinlich, dass die Cannabinoid-induzierten Effekte auf die Zell-zu-Zell-Kommunikation via gap junctions zumindest teilweise über CB<sub>1</sub>-unabhängige Mechanismen vermittelt werden. In den Organbadexperimenten wurden für die Hemmung der EDHF-vermittelten Gefäßrelaxationen in Schweinekoronararterien jeweils deutlich höhere Konzentrationen von THC und HU210 benötigt als sie für eine selektive Aktivierung der CB-Rezeptoren notwendig sind. Obwohl über den CB<sub>1</sub>-Rezeptor das inhibitorische G-Protein G $\alpha_i$  aktiviert werden kann und es daraufhin konsekutiv zu einer Hemmung der Adenylylzyklase sowie zu einer Aktivierung von ERK1/2 kommt (Howlett *et al.*, 1986; Childers *et al.*, 1992; Childers *et al.*, 1993), findet sich in verschiedenen Studien bereits der Nachweis, dass die Aktivierung dieser Enzymkaskade in Astrozyten und Fibroblasten nicht rezeptorvermittelt ist (Bouaboula *et al.*, 1995; Bouaboula *et al.*, 1996; Bayewitch *et al.*, 1995). Und obwohl die Hemmung der Adenylylzyklase via G $\alpha_i$  die Aktivierung der MAP-Kinasen zu vermitteln vermag (Haneda *et al.*, 1996), ist dieser Mechanismus nicht verantwortlich für die CB-Agonist-induzierte Aktivierung dieser Enzyme in Astrozyten. (Bouaboula *et al.*, 1995). Viele beobachtete Effekte von Cannabinoiden wurden daher als rezeptorunabhängige Ereignisse eingeordnet. So hemmen beispielsweise hohe Konzentrationen von CB-Agonisten die Bildung des "second messengers" Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) (Nah *et al.*, 1993) und führen zu einer Freisetzung intrazellulären Calciums (Felder *et al.*, 1992; 1993) sowie zu einer Freisetzung von Arachidonsäure (Howlett *et al.*, 1995). Ein möglicher Erklärungsansatz für diese rezeptorunabhängigen Effekte ist die direkte Einlagerung der Cannabinoide in die Zellmembran und eine dadurch bedingte direkte Beeinflussung von integrierten Membranproteinen wie z.B. G $\alpha_i$  (Bayewitch *et al.*, 1995).

Auch die hemmenden Effekte der Cannabinoide auf die EDHF-vermittelten Gefäßrelaxationen und -hyperpolarisationen bzw. ihre entkoppelnden Eigenschaften auf die gap junctions nach Aktivierung der MAP-Kinasen Kaskade sind am wahrscheinlichsten durch

eine Cannabinoideinlagerung in die Zellmembran mit direkter Beeinflussung integraler Membranproteine zu erklären. Für die Evaluierung der exakten Signalkaskade Cannabinoid-induzierter Effekte sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Eine essentielle Beteiligung eines CB-Rezeptors hieran ist jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

#### **4.5 Beteiligung von ERK1/2 an der Cannabinoid-induzierten Hemmung EDHF-vermittelter Hyperpolarisation und Relaxation**

Nachdem festgestellt werden konnte, dass Cannabinoide ERK1/2 aktivieren, wurde nun eine mögliche Beteiligung von ERK1/2 an einem Cannabinoid-Signaltransduktionsweg mittels Organbadexperimenten und Membranpotentialaufzeichnungen näher untersucht. Die Hemmstoffe der ERK1/2-Aktivierung PD98059 sowie U0126 waren jeweils in der Lage, die durch  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol induzierte Hemmung der EDHF-vermittelten Relaxation und Hyperpolarisation aufzuheben, ohne einen Einfluss auf die NO-vermittelte Relaxation zu nehmen. Daneben verbesserten PD98059 und U0126 in Abwesenheit von  $\Delta^9$ -THC die Bradykinin-induzierte EDHF-vermittelte Relaxation gegenüber Kontrollgefäßen und führten zudem zu einer Desensibilisierung gegenüber dem Vasokonstriktor U46619. Dies legt eine zentrale Rolle von ERK1/2 in der Cannabinoid-induzierten Hemmung der EDHF-vermittelten Gefäßrelaxation nahe. Der zelluläre Mechanismus, über welchen die MAP-Kinasen die Cannabinoid-induzierte EDHF-Hemmung vermitteln, ist jedoch noch ungeklärt. Möglicherweise kommt es nach ERK1/2-Aktivierung zu Phosphorylierungsprozessen von für die EDHF-Antwort essentiellen Proteinen, wie z.B. der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase oder  $\text{K}^+$ -Kanälen. Ein solcher Mechanismus konnte bereits für spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle im Gehirn nachgewiesen werden (Adams *et al.*, 2000; Ekinci *et al.*, 1999).

#### 4.6 Einfluss von ERK1/2 auf die Funktion von gap junctions in Endothelzellen

Die direkte heterozelluläre Kommunikation via gap junctions zwischen Endothel und glatter Muskelzelle trägt zur Endothel-vermittelten Hyperpolarisation und Relaxation essentiell bei. Dies konnte vor allem für Widerstandsgefäße gezeigt werden (Chaytor *et al.*, 1998). Die EDHF-vermittelte Hyperpolarisation und Relaxation wird in Schweinekoronararterien durch vorherige Inkubation mit Cannabinoiden gehemmt, wobei ERK1/2 nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle einnehmen. Dies lässt vermuten, dass ERK1/2 bei der Hemmung der EDHF-vermittelten Relaxation und Hyperpolarisation nach Inkubation mit  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol einen Einfluss auf die Struktur bzw. Funktion von gap junctions in Endothelzellen haben und dadurch die Cannabinoid-induzierten Effekte auf die EDHF-vermittelten Gefäßprozesse erklärt werden können.

Gap junctions sind Membranproteine, die zwei benachbarte Zellen miteinander verbinden. Sie bestehen aus zwei Halbkanälen, den Connexonen, von denen jede der beiden Nachbarzellen eines zur gemeinsamen gap junction beisteuert. Diese Connexone koppeln aneinander und schaffen so eine Verbindung vom Zytosol der einen Zelle zum Zytosol der anderen. Die Connexone bestehen jeweils aus sechs Connexin-Proteinen in einer klassischen pentalaminären Struktur. Etwa 80% der gap junctions in einem Kontaktbereich zwischen zwei Nachbarzellen sollen sich in einem geöffneten Zustand befinden. Damit wird ein Transfer von elektrischen sowie chemischen Valenzen mit einer Molekülgröße von unter 1kDa ermöglicht (Dhein, 1998). Die Passage von kleinen Molekülen und Ionen durch gap junctions kann durch einige Mechanismen verstärkt bzw. abgeschwächt werden. Dazu gehören die Änderungen des intrazellulären pH-Werts, des Membranpotentials und des Phosphorylierungszustands der Connexin-Proteine (Lampe & Lau, 2000). Auf der einen Seite wird durch die Phosphorylierung der Connexin-Proteine die interzelluläre Permeabilität gesteigert, wie z.B. für die Proteinkinase A gezeigt werden konnte. Sie führt durch die Phosphorylierung von Connexin 43 zu einer Translokation des Proteins in die Plasmamembran und bewirkt dadurch eine Steigerung der interzellulären Permeabilität z.B. für den Indikatorfarbstoff Luciferyellow (Gewicht: 443 Da) (Lampe & Lau, 2000). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung spezifischer Aminosäuren der Connexin-Proteine durch Proteinkinasen wie Scr (Tyr<sup>247</sup> und Tyr<sup>265</sup>), (Lin *et al.*, 2001), Proteinkinase C (Ser<sup>268</sup>), (Lampe *et al.*, 2000) und ERK1/2 MAP-Kinasen (Ser<sup>279</sup> und Ser<sup>282</sup>), (Zhou *et al.*, 1999) die Permeabilität für Farbstoffe wie Luciferyellow herabsetzen.

Mit Hilfe der Immunpräzipitation und Western Blot Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Cannabinoide  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol und HU210 zu einer Phosphorylierung von Connexin 43 führen. Dadurch kommt es zu einer Hemmung der interzellulären Kommunikation via gap junctions (Brandes *et al.*, 2002). Diese Cannabinoid-induzierte Blockierung der gap junction-Permeabilität konnte selektiv durch Substanzen verhindert werden, die die MAP-Kinase-Kinase (MEK) und damit die Aktivierung der MAP-Kinasen wie ERK1/2 hemmen. Daher ist sehr wahrscheinlich, dass die Aktivierung der ERK1/2 MAP-Kinasen durch Cannabinoide über eine Phosphorylierung von Connexin 43 zu einer signifikanten Permeabilitätsabnahme der gap junctions zwischen Endothelzellen führt.

#### **4.7 Rolle von myoendothelialen gap junctions an der EDHF-vermittelten Gefäßrelaxation in Schweinekoronararterien**

Durch eine Reihe von Untersuchungen konnte herausgearbeitet werden, dass eine direkte elektrochemische Kommunikation zwischen Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen an der Regulation des Gefäßtonus, insbesondere der aufsteigenden Dilatation maßgeblich beteiligt ist. An diesen Regulationsvorgängen sind sowohl homozelluläre gap junctions zwischen zwei Endothelzellen bzw. zwei glatten Gefäßmuskelzellen daneben aber auch heterozelluläre gap junctions zwischen Endothelzelle und glatter Gefäßmuskelzelle involviert (de Wit *et al.*, 2000; Emerson & Segal, 2000). Auch für die NO/PGI<sub>2</sub>-unabhängige, EDHF-vermittelte Relaxation konnte in einigen Gefäßen eine essentielle Rolle der gap junctions herausgearbeitet werden (Chaytor *et al.*, 1998; Brandes *et al.*, 2000). Ein Kennzeichen der EDHF-vermittelten Gefäßrelaxation ist, dass sie von einer Membranhyperpolarisation begleitet wird. Diese in den Endothelzellen generierte Hyperpolarisation ist imstande, über myoendotheliale gap junctions auf die glatte Gefäßmuskulatur überzugreifen. (Yamamoto *et al.*, 1999 Emerson *et al.*, 2000 Sandow *et al.*, 2000). Am schlüssigsten wurde die Rolle der gap junctions in der Herstellung eines elektrischen Synzytiums zwischen Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen in kleinen Widerstandsgefäßen demonstriert (de Wit *et al.*, 2000; Coleman *et al.*, 2001). Unterstützung erhält die Hypothese der durch myoendotheliale gap junctions auf die Gefäßmuskulatur übertragenen Hyperpolarisation von Studien, in denen die gap junctions pharmakologisch blockiert wurden. In diesen Studien fand ein von Griffith *et al.* entwickeltes Peptid Verwendung (Gap27), welches basierend auf der Aminosäuresequenz eines extrazellulär gelegenen Connexin 43-Abschnitts zu einer selektiven Hemmung von



Cx43 führen sollte (Chaytor *et al.*, 1998; Chaytor *et al.*, 1997; Dora *et al.*, 1998). Ferner wurden die Derivate der Glycyrrhetinsäure (Imaeda *et al.*, 2000; Santicioli *et al.*, 2000, Coleman *et al.*, 2001) zur gap junction-Blockade verwendet. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass gap junctions beim Phänomen der EDHF-vermittelten Gefäßrelaxation maßgeblich beteiligt sein müssen.

Ob diese Hypothese auch für das koronare Stromgebiet zutrifft, wurde durch Organbadversuche mit den gap junction-Hemmstoffen 18 $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure, 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon näher untersucht. In diesen Versuchen konnte jedoch kein Effekt dieser Substanzen auf die EDHF-vermittelten Gefäßrelaxation beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine zentrale Rolle der myoendothelialen gap junctions an der EDHF-vermittelten Relaxation in Schweinekoronararterien. In einigen größeren Arterien sind gap junctions eher beim Transfer der Hyperpolarisation zwischen den glatten Muskelzellen als bei der Vermittlung der Hyperpolarisation zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskelzelle beteiligt (Edwards *et al.*, 1999). In Koronargefäßen ist eine zentrale Rolle von gap junctions an der Regulation des Gefäßtonus sehr fraglich. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der „klassische“ gap junction Blocker 18 $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure sowie Palmitolsäure die EDHF-vermittelte Relaxation von Koronararterienringen nicht beeinflusst (Beny & Schaad, 2000) – ein Befund, der sich mit den Ergebnissen in dieser Arbeit deckt – während bemerkenswerterweise die Agonist-induzierte Hyperpolarisation von koronaren glatten Muskelzellen durch die Blockade der gap junctions in ihrer Ausbreitung gehemmt wird (Edwards *et al.*, 1999).

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde bezüglich der Cannabinoid-induzierten Hemmung EDHF-vermittelter Hyperpolarisation und Relaxation von Schweinekoronararterien auf der einen Seite sowie der Nachweis einer Unterbrechung der Zell-zu-Zell Kommunikation via gap junctions zwischen den Endothelzellen nach Cannabinoid-Stimulation auf der anderen Seite (im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgestellt, siehe Brandes *et al.*, 2002), ließen zunächst vermuten, dass das Phänomen der EDHF-vermittelten Gefäßrelaxation maßgeblich über myoendotheliale gap junctions vermittelt wird. Diese Hypothese konnte jedoch aufgrund der Ergebnisse der Organbadversuche, in denen die „klassischen“ gap junction-Blocker die EDHF-vermittelte Relaxation von Koronararterienringen nicht beeinflussen konnten, nicht aufrechterhalten werden.

Andere Studien bezweifeln eine ausreichende Spezifität der „klassischen“ gap junction-Hemmer, da sowohl dosis- als auch gewebsabhängige nicht-spezifische Effekte beobachtet werden konnten (Santicioli & Maggi, 2000; Taylor *et al.*, 1998). Dies würde sämtliche

Ergebnisse, die mithilfe dieser Substanzen gewonnen werden konnten, im Hinblick auf ihre Spezifität in Frage stellen. Für eine spezifische Blockade myoendothelialer gap junctions ohne Beeinflussung der elektrischen Kommunikation zwischen glatten Gefäßmuskelzellen stehen zur Zeit keine geeigneten pharmakologischen Mittel zur Verfügung (Fleming *et al.*, 2000; Edwards & Weston, 2001). Daher sind in Zukunft weitere Studien erforderlich, die eine Beteiligung der myoendothelialen gap junctions an EDHF-vermittelten Prozessen untermauern bzw. ausschließen.

#### 4.8 Effekt von 11,12-EET und Bradykinin auf die Aktivität von ERK1/2

Mit Hilfe der Westernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von HUVEC mit Bradykinin zu einer Aktivierung von ERK1/2 führt (siehe auch Fleming *et al.*, 1995). Zudem verbesserten in den Organbadexperimenten die MAP-Kinase-Inhibitoren PD98059 und U0126 auch in Abwesenheit von  $\Delta^9$ -THC die Bradykinin-induzierte EDHF-vermittelte Relaxation in Schweinekoronararterien. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Aktivierung von ERK1/2 EDHF-vermittelte Relaxationen funktionell antagonisiert. Die Aktivierung von ERK1/2 durch Agonisten an Rezeptoren der Endothelzelle wie beispielsweise Bradykinin führt also möglicherweise zu einem negativen Feedback-Mechanismus auf EDHF-vermittelte Gefäßrelaxationen, welcher zentral durch ERK1/2 gesteuert wird. Mit Hilfe der Membranpotentialmessungen konnte im Rahmen unserer Studie ferner gezeigt werden, dass die Hemmung von ERK1/2 zu einer signifikanten Hyperpolarisation in der glatten Muskelzelle der Schweinekoronararterie führt und die Repolarisationsphase nach einer Bradykinin-Exposition verlängert (Brandes *et al.*, 2002). Dies führt zu der Hypothese, dass ERK1/2 auch am transienten Verlauf einer EDHF-Antwort maßgeblich beteiligt sind. Die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation zeigt im Normalfall nur eine kurzfristige Relaxation und Hyperpolarisation, worauf sich recht schnell Repolarisationsvorgänge und eine allgemeine Abschwächung der Relaxation (Rekontraktion) anschließen. Dies war nach Hemmung von ERK1/2 nicht mehr der Fall. Ob diese Veränderungen der EDHF-vermittelten Hyperpolarisation dadurch zu erklären sind, dass ERK1/2 die Effektoren von EDHF - wie beispielsweise Kaliumkanäle und/oder die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase - modulieren, bedarf weiterer Untersuchungen.

11,12-Epoxyeicosatriensäure (11,12-EET), ein CYP-Derivat der Arachidonsäure, von dem angenommen wird, es könne sich in Koronargefäßen um EDHF handeln (Quilley *et al.*, 2000)

führte in HUVEC ebenfalls zu einer Aktivierung von ERK1/2. Cannabinoide, Bradykinin und 11,12-Epoxyeicosatriensäure sind demnach unabhängig voneinander in der Lage, zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen zu führen. Dabei benutzen sie grundsätzlich verschiedene Signaltransduktionskaskaden. Während die Cannabinoide wie diskutiert durch eine direkte Interkalation in die Zellmembran das inhibitorische  $G\alpha_i$ -Protein aktivieren und dadurch die ras/raf/MEK/MAP-Kaskade aktiviert wird (Howlett *et al.*, 1986; Childers *et al.*, 1992; Pacheco *et al.*, 1992), aktiviert Bradykinin die MAP-Kinasen über die Freisetzung von Calcium und  $IP_3$  ohne Beteiligung des  $G\alpha_i$ -Proteins (Fleming *et al.*, 1995). EETs aktivieren  $G_s$ -Proteine (Fleming *et al.*, 1995), was dann über eine aktivierte scr-Tyrosinkinase die Aktivierung der MAP-Kinasen hervorruft (Chen *et al.*, 2000).

## 5. Zusammenfassung

Das vaskuläre Endothel ist in der Lage vasoaktive Autakoide zu synthetisieren und nach entsprechenden neurohumoralen Stimuli (z.B. Bradykinin oder Acetylcholin) oder aber physikalischen Reizen, (z.B. Schubspannung oder Scherkräften) an die Umgebung abzugeben. Neben gefäßkontrahierenden Substanzen wie dem mitogenen Peptid Endothelin produziert das Endothel vasodilatierende Substanzen, von denen bislang drei identifiziert werden konnten: NO, Prostazyklin und der in seiner chemischen Struktur noch umstrittene EDHF ("endothelium-derived hyperpolarising factor"). Während die Struktur und Wirkungsweise von NO sowie Prostazyklin bereits sehr gut charakterisiert werden konnten, existieren diesbezüglich bei EDHF noch kontroverse Vorstellungen.

Cannabinoide, deren hypotensiven und Bradykardie-auslösenden Wirkungen schon längere Zeit bekannt sind, sind potente Hemmstoffe der EDHF-vermittelten Relaxation und Hyperpolarisation. Mit dieser Arbeit sollte der dieser Hemmung zugrunde liegende zelluläre Mechanismus näher untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol und der Cannabinoidrezeptoragonist HU210 in kultivierten Endothelzellen zu einer vermehrten Phosphorylierung und damit Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen1/2 (ERK1/2) führen.  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol bewirkt daneben auch eine Phosphorylierung des gap junction Proteins Connexin 43 und unterbindet somit die Zell-zu-Zell-Kommunikation via gap junctions. Die Phosphorylierung von Connexin 43 war empfindlich gegenüber PD98059 und U0126, zwei Hemmstoffen der ERK1/2-Aktivierung. Die Hemmung der EDHF-vermittelten Hyperpolarisation und Relaxation vorkontrahierter Schweinekoronararterien durch  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol konnte ebenfalls durch PD98059 und U0126 verhindert werden. Daneben bewirkten PD98059 und U0126 allein eine Linksverschiebung der Konzentrations-Relaxations-Kurve nach Gabe von Bradykinin hinsichtlich EDHF-vermittelter Relaxationen, ohne jedoch die NO-abhängige Relaxation oder den Tonus des Gefäßes zu beeinflussen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Cannabinoid-induzierte Aktivierung von ERK1/2 über eine Phosphorylierung der Connexin-43-Proteine eine Unterbrechung der Zell-zu-Zell-Kommunikation via gap junctions zur Folge hat. Dies führte zu der Hypothese, dass ERK1/2 an der EDHF-vermittelten Hyperpolarisation und Relaxation, insbesondere der Weiterleitung der Hyperpolarisation vom Endothel zur glatten Muskelzelle über gap junctions zentral steuernd beteiligt sind und damit zumindest anteilig für die Cannabinoid-induzierten Hemmung EDHF-vermittelter Gefäßrelaxationen verantwortlich gemacht werden können. Die dabei

zugrunde liegende Vorstellung einer zentralen Rolle der myoendothelialen gap junctions an der EDHF-vermittelten Relaxation in Schweinekoronararterien konnte jedoch in Organbadexperimenten nicht bestätigt werden, da die typischen gap junction-Blocker (18 $\alpha$ -Glyzyrrhetinsäure, 18 $\beta$ -Glyzyrrhetinsäure und Carbenoxolon) keine Hemmung EDHF-vermittelter Gefäßrelaxationen bewirken konnten. Es ist somit unklar, inwieweit eine Cannabinoid-induzierte, ERK1/2-vermittelte Entkopplung der Zell-zu-Zell-Kommunikation via gap junctions and der Cannabinoid-induzierten Hemmung EDHF-vermittelter Gefäßrelaxationen beteiligt ist.

## Summary

Vascular endothelial cells produce vasoactive autacoids, which are released after exposure to neurohumoral/chemical (i.e. acetylcholine, bradykinin) or mechanical stimuli (i.e. shear stress). The best characterized endothelium-derived relaxing factors are nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>). An additional third NO/PGI<sub>2</sub>-independent endothelium-derived relaxing factor mediates vasodilatation by an endothelium-dependent hyperpolarisation of vascular smooth muscle cells (endothelium derived hyperpolarising factor ; EDHF). The nature of EDHF still remains to be determined but epoxyeicosatrienoic acids (EET), anandamide, extracellular potassium and electronic coupling via myoendothelial gap junctions have been suggested to contribute to EDHF-mediated hyperpolarisation and relaxation of vascular smooth muscle.

Cannabinoids, which elicit hypotension and bradycardia in vivo, are potent inhibitors of EDHF-mediated relaxations. The identification of the underlying mechanism of this effect was the aim of this thesis. In cultured endothelial cells  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and the cannabinoid receptor agonist HU210 increased the phosphorylation and activity of extracellular regulated kinases 1/2 (ERK1/2).  $\Delta^9$ -THC elicited an increase in the phosphorylation of connexin 43, which was sensitive to MAP-kinase-kinase inhibitors PD98059 and U0126. Cannabinoid-induced inhibition of EDHF-mediated responses of precontracted rings of porcine coronary artery was prevented by PD98059 and U0126. In the absence of  $\Delta^9$ -THC, neither PD98059 nor U0126 affected the NO-mediated relaxation of coronary artery rings but both substances induced a leftward-shift in concentration-relaxation curve to bradykinin when diclofenac and N<sup>9</sup>-nitro-arginine were present.

These results indicate that the cannabinoid-induced activation of ERK1/2, which leads to the phosphorylation of connexin 43, disrupts gap junctional communication and therefore may partially account for the  $\Delta^9$ -THC-induced inhibition of EDHF-mediated relaxations. The concept of a central role for myoendothelial gap junctions in mediating EDHF in porcine coronary artery however could not be verified in the present study, because classic gap junction blockers did not have an effect on EDHF-mediated responses in coronary artery rings. Therefore, it remains to be determined how far the results of a cannabinoid-induced, ERK1/2-mediated disruption of gap junctional communication underlies the cannabinoid-induced inhibition of EDHF-mediated responses.

## 6. Literatur

- Adams, J.P., Anderson, A.E., Varga, A.W., Dineley, K.T., Cook, R.G., Pfaffinger, P.J., und Sweatt, J.D. (2000). The A-type potassium channel Kv4.2 is a substrate for the mitogen-activated protein kinase ERK. *J.Neurochem.* **75**: 2277-87.
- Änggård, E.E. (1992). The regulatory functions of the endothelium. *Jpn.J.Pharmacol.* **58 Suppl 2**: 200-206.
- Arima, S., Endo, Y., Yaoita, H., Omata, K., Ogawa, S., Tsunoda, K., Abe, M., Takeuchi, K., Abe, K., und Ito, S. (1997). Possible role of P-450 metabolite of arachidonic acid in vasodilator mechanism of angiotensin II type 2 receptor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J.Clin.Invest* **100**: 2816-2823.
- Baron, A., Frieden, M., und Beny, J.L. (1997). Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance, Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channel on pig coronary artery endothelial cells. *J. Physiol.(Lond.)* **504**: 537-543.
- Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Barg, J., Mechoulam, R., und Vogel, Z. (1995). The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett.* **375**:143-147.
- Beny, J.L. (1990). Endothelial and smooth muscle cells hyperpolarised by bradykinin are not dye coupled. *Am.J.Physiol.* **258**: 836-841.
- Beny, J.L., und Schaad, O. (2000). An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries. *Br.J.Pharmacol.* **131**: 965-973.
- Bolton, T.B., Lang, J.R., und Takewaki, T. (1984). Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J.Physiol.(Lond.)* **351**: 549-572.

- Bolz, S.S., Fisslthaler, B., Pieperhoff, S., De Wit, C., Fleming, I., Busse, R., und Pohl, U. (2000). Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated  $\text{Ca}(2+)$  changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J.* **14**: 255-260.
- Bouaboula, M., Perrachon, S., Milligan, L., Canat, X., Rinaldi-Carmona, M., Portier, M., Barth, F., Calandra, B., Pecceu, F., Lupker, J., Maffrand, J.P., Le Fur, G., und Casellas, P. (1997). A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J.Biol. Chem.* **272**: 22330-22339.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., und Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem.J.* **312**: 637-641.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M., Calandra, B., Le Fur, G., und Casellas, P. (1996). Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur.J.Biochem.* **237**: 704-711.
- Bradford, M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**: 248-254.
- Brandes, R.P., Popp, R., Ott, G., Bredenkotter, D., Wallner, C., Busse, R., und Fleming, I. (2002). The extracellular regulated kinases (ERK) 1/2 mediate cannabinoid-induced inhibition of gap junctional communication in endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.* **136**: 709-716.



- Brandes, R.P., Schmitz-Winnenthal, F.H., Feletou, M., Godecke, A., Huang, P.L., Vanhoutte, P.M., Fleming, I., und Busse, R. (2000). An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A*. **97**: 9747-9752.
- Brayden, J.E., und Nelson, M.T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* **256**: 532-535.
- Burnham, M.P., Bychkov, R., Feletou, M., Richards, G.R., Vanhoutte, P.M., Weston, A.H., und Edwards, G. (2002). Characterization of an apamin-sensitive small-conductance  $\text{Ca}(2+)$ -activated  $\text{K}(+)$  channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF. *Br.J.Pharmacol.* **135**: 1133-1143.
- Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P.M., and Weston, A.H. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol.Sci.* **8**: 374-380.
- Busse, R., Fleming, I., Hecker, M. (1993). Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation. *Eur Heart J.* **14 Suppl 1**: 2-9.
- Cai, S., Garneau, L., und Sauve, R.(1998). Single-channel characterization of the pharmacological properties of the  $\text{K}(\text{Ca}2+)$  channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. *J.Membr.Biol* **163**: 147-158.
- Campbell, W.B., Gebremedhin, D., Pratt, P.F., und Harder, D.R. (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ.Res.* **78**: 415-423.
- Chataigneau, T., Feletou, M., Duhault, J., und Vanhoutte, P.M. (1998a). Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br.J.Pharmacol* **123**: 574-580.

- Chataigneau, T., Feletou, M., Thollon, C., Villeneuve, N., Vilaine, J.P., Duhault, J., und Vanhoutte, P.M. (1998b). Cannabinoid CB1 receptor and endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig carotid, rat mesenteric and porcine coronary arteries. *Br.J.Pharmacol.* **123**: 968-974.
- Chaytor, A.T., Evans, W.H., und Griffith, T.M. (1997). Peptides homologous to extracellular loop motifs of connexin 43 reversibly abolish rhythmic contractile activity in rabbit arteries. *J.Physiol.(Lond.)* **503**: 99-110.
- Chaytor, A.T., Evans, W.H., und Griffith, T.M. (1998). Central role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent relaxations of rabbit arteries. *J.Physiol. (Lond.)* **508**: 561-573.
- Chaytor, A.T., Martin, P.E., Evans, W.H., Randall, M.D., und Griffith, T.M. (1999). The endothelial component of cannabinoid-induced relaxation in rabbit mesenteric artery depends on gap junctional communication. *J.Physiol.(Lond.)* **520**: 539-550.
- Chen, J.K., Capdevila, J., und Harris, R.C. (2000). Overexpression of C-terminal Src kinase blocks 14,15-epoxyeicosatrienoic acid-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *J.Biol.Chem* **275**: 13789-13792.
- Chen, G., Suzuki, H., und Weston, A.H., (1988). Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarising factor and EDRF from rat blood vessels. *Br.J.Pharmacol.* **95**: 1165-1174.
- Childers, S.R., Fleming, L., Konkoy, C., Marckel, D., Pacheco, M., Sexton, T., und Ward, S. (1992). Opioid and cannabinoid receptor inhibition of adenylyl cyclase in brain. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **654**: 33-51.
- Childers, S.R., Pacheco, M.A., Bennett, B.A., Edwards, T.A., Hampson, R.E., Mu, J., und Deadwyler, S.A. (1993). Cannabinoid receptors: G-protein-mediated signal transduction mechanisms. *Biochem.Soc.Symp.* **59**: 27-50.

- Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P.C., Pan, Y.C., Olander, J.V., Connolly, D.T., Stern, D. (1990). Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J.Exp.Med* **172**:1535-45.
- Coleman, H.A., Tare, M., and Parkinson, H.C. (2001). K<sup>+</sup> currents underlying the action of endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig, rat and human blood vessels. *J.Physiol.(Lond.)* **531**: 359-373.
- Corriu, C., Feletou, M., Canet, E., und Vanhoutte, P.M. (1996). Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br.J.Pharmacol.* **119**: 959-964.
- Cowan, C.L. und Cohen, R.A. (1991). Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am.J.Physiol.* **261**: 830-835.
- Darius, H., Binz, C., Veit, K., Fisch, A., Meyer, J. (1995): Platelet receptor desensitization induced by elevated prostacyclin levels causes platelet-endothelial cell adhesion. *J.Am. Coll.Cardiol* **26**: 800-806.
- de Wit, C., Roos, F., Bolz, S.S., Kirchhoff, S., Kruger, O., Willecke, K., und Pohl, U. (2000). Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circ.Res.* **86**: 649-655.
- Dhein S. (1998). Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. *Trends.Pharmacol.Sci.* **19**: 229-241.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., und Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependant phosphorylation. *Nature* **399**: 601-605.

- Ding, H., Kubes, P., und Triggle, C.R. (2000). Potassium- and acetylcholine-induced vasorelaxation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br.J.Physiol.* **129**: 1194-1200.
- Dora, K.A., Martin, P.E., Chaytor, A.T., Evans, W.H., Garland, C.J., und Griffith, T.M. (1999). Role of heterocellular Gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: inhibition by a connexin-mimetic peptide. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **254**: 27-31.
- Ekinci, F.J., Malik, K.U., und Shea, T.B.(1999). Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to beta-amyloid. MAP kinase mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J.Biol.Chem.* **274**: 30322-30337.
- Edwards, G., Dora, K.A., Gardener, M.J., Garland, C.J., und Weston, A.H. (1998). K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* **396**: 269-272.
- Edwards, G., Feletou, M., Gardener, M.J., Thollon, C., Vanhoutte, P.M., und Weston, A.H. (1999). Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br.J.Pharmacol.* **128**: 1788-1794.
- Edwards, G., Weston, A.H. (2001). EDHF -- are there gaps in the pathway? *J.Physiol.* **531**: 299.
- Emerson, G.G, und Segal, S.S. (2000). Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control. *Circ.Res.* **87**: 474-479.
- Emerson, G.G., und Segal, S.S. (2001). Electrical activation of endothelium evokes vasodilation and hyperpolarization along hamster feed arteries. *Am.J.Physiol.* **280**: 160-167.

- Felder, C.C., Briley, E.M., Axelrod, J., Simpson, J.T., Mackie, K., und Devane, W.A.(1993). Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc.Natl. Acad.Sci.U S A*. **90**: 7656-7660.
- Felder, C.C., Veluz, J.S., Williams, H.L., Briley, E.M., und Matsuda, L.A. (1992). Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. *Mol.Pharmacol*. **42**: 838-845.
- Feletou, M., und Vanhoutte, P.M. (1988): Endothelium dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br.J.Pharmacol*. **93**: 515-524.
- Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D.R., Fleming, I., und Busse, R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* **30**; **401**: 493-497.
- Fleming I. (2000). Myoendothelial gap junctions: the gap is there, but does EDHF go through it? *Circ Res*. **86**: 249-250.
- Fleming, I., Fisslthaler, B., und Busse, R. (1995). Calcium signaling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinases. *Circ.Res*. **76**: 522-529.
- Fleming, I., Schermer, B., Popp, R., und Busse, R. (1999). Inhibition of the production of endothelium-derived hyperpolarizing factor by cannabinoid receptor agonists. *Br.J.Pharmacol*. **126**: 949-960.
- Fukao, M., Hattori, Y., Kanno, M., Sakuma, I., und Kitabatake, A. (1995). Thapsigargin- and cyclopiazonic acid-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol* **115**: 987-992.

- Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., und Sessa, W.C., (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**: 597-601.
- Furchgott, R.F., Cherry, P.D., Zawadzki, J.W. und Jothianandan, D.(1984). Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **6 Suppl 2**: 336-343.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.W. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376.
- Garg, U.C., Hassid, A. (1989). Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxide-generating vasodilators. *Am J Physiol* **257**: 60-66.
- Garland, J.G. und McPherson, G.A. (1992). Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarisation and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.* **105**: 429-435.
- Garland, C.J., und Plane, F., (1996). Relative importance of endothelium-derived hyperpolarising factor for the relaxation of vascular smooth muscle in different arterial beds. In *Endothelium-Derived Hyperpolarising Factor (Vol.1)*, (Vanhoutte, P.M., ed.), pp173-179, Harwood Academic Publishers.
- Gebremedhin, D., Harder, D.R., Pratt, P.F., und Campbell W.B. (1998). Bioassay of an endothelium-derived hyperpolarizing factor from bovine coronary arteries: role of a cytochrome P450 metabolite. *J.Vasc.Res* **35**: 274-284.
- Gimbrone M.A. Jr. (1995). Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am.J.Cardiol* **75**: 67-70.
- Haneda, M., Araki, S., Sugimoto, T., Togawa, M., Koya, D., und Kikkawa, R. (1996) Differential inhibition of mesangial MAP kinase cascade by cyclic nucleotides. *Kidney.Int.* **50**: 384-391.

- Harlan, J.M. (1987). Consequences of leukocyte-vessel wall interactions in inflammatory and immune reactions. *Semin.Thromb.Hemost.* **13**: 434-444.
- Harris, D., Kendall, D.A., Randall, M.D. (1999) Characterization of cannabinoid receptors coupled to vasorelaxation by endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **359**: 48-52.
- Harris, D., Martin, P.E., Evans, W.H., Kendall, D.A., Griffith, T.M., und Randall, M.D. (2000) Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanisms of K(+)-relaxation. *Eur.J.Pharmacol* **402**: 119-128.
- Hecker, M., Bara, A.T., Bauersachs, J., und Busse, R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J.Physiol.(Lond.)* **481**: 407-414.
- Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T., Munzel, T. (2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **104**: 2673-2678.
- Hoebel, B.G., Kostner, G.M., und Graier, W.F. (1997). Activation of microsomal cytochrome P450 mono-oxygenase by Ca<sup>2+</sup> store depletion and its contribution to Ca<sup>2+</sup> entry in porcine aortic endothelial cells. *Br.J.Pharmacol* **121**: 1579-1588.
- Hong, T., und Hill, C.E. (1998). Restricted expression of the gap junctional protein connexin 43 in the arterial system of the rat. *J.Anat.* **192**: 583-593.
- Howlett, A.C. (1995). Cannabinoid compounds and signal transduction mechanisms. (ed R.G. Pert), pp 167-204, London.
- Howlett, A.C., Qualy, J.M., und Khachatrian, L.L. (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol.Pharmacol.* **29**: 307-313.

- Illiano, S., Nagao, T. und Vanhoutte, P.M. (1992). Calmidazolium, a calmodulin inhibitor, inhibits endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the canine coronary artery. *Br.J.Pharmacol.* **107**: 387-392.
- Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M., Woods, K.S. (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res.* **61**: 866-879.
- Imaeda, K., Yamamoto, Y., Fukuta, H., Koshita, M., und Suzuki, H. (2000). Hyperpolarization-induced dilatation of submucosal arterioles in the guinea-pig ileum. *Br.J.Pharmacol.* **131**: 1121-1128.
- Johns, A. Freay, A.D., Adams, D.J., Lategan, T.W., Ryan, U.S., und van Breemen, C. (1988). Role of calcium in the activation of endothelial cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **12**: 119-123.
- Kaiser, L. und Sparks, H.V.J. (1987). Endothelial cells. Not just a cellophane wrapper. *Arch.Intern.Med.* **147**: 569-573.
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., und Murad, F. (1977). Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J.Cyclic.Nucleotide.Res.* **3**: 23-35.
- Kessler, P., Lischke, V., und Hecker, M. (1996). Etomidate and thiopental inhibit the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human renal artery. *Anesthesiology* **84**:1485-1488.
- Knot, H.J., Zimmermann, P.A., und Nelson, M.T. (1996). Extracellular K(+)-induced hyperpolarisations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels. *J.Physiol.(Lond.)* **492**: 419-430.



- Lacy, P.S., Pilkington, G., Hanvesakul, R., Fish, H.J., Boyle, J.P., and Thurston, H. (2000). Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries. *Br.J.Pharmacol* **129**: 605-611.
- Lampe, P.D. & Lau, A.F. (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch.Biochem.Biophys.* **384**: 205-215.
- Lampe, P.D., TenBroek, E.M., Burt, J.M., Kurata, W.E., Johnson, R.G., und Lau, A.F. (2000). Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J.Cell.Biol.* **149**:1503-1512.
- Li, P.L., und Campbell, W.B. (1997). Epoxyeicosatrienoic acids activate K<sup>+</sup> channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein. *Circ.Res.* **80**: 877-884.
- Lin, R., Warn-Cramer, B.J., Kurata, W.E., und Lau, A.F. (2001). v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J.Cell.Biol* **154**: 815-827.
- Liu, J., Gao, B., Mirshahi, F., Sanyal, A.J., Khanolkar, A.D., Makriyannis, A., und Kunos, G. (2000). Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem.J.* **346**: 835-840.
- Lückhoff, A., Pohl, U., Mülsch, A., und Busse, R. (1988). Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.* **95**: 189-196.
- Mackie, K., und Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A.* **89**: 3825-3829.
- Marchenko, S.M., und Sage, S.O. (1996) Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. *J.Physiol.(Lond.)* **492**: 53-60.

- Mombouli, J.V., Bissiriou, I., Agboton, V.D., und Vanhoutte, P.M. (1996). Bioassay of endothelium-derived hyperpolarising factor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **221**: 484-488.
- Mombouli, J.V., Illiano, S., Nagao, T., Scott-Burden, T., und Vanhoutte, P.M. (1992). Potentiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium derived relaxing and hyperpolarising factors. *Circ.Res.* **71**: 137-144.
- Mombouli, J.V., Schaeffer, G., Holzmann, S., Kostner, G.M., und Graier, W.F. (1999). Anandamide-induced mobilization of cytosolic  $Ca^{2+}$  in endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.* **126**: 1593-1600.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., und Vane, J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**: 663-665.
- Moncada, S., Vane, J.R. (1979). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxan A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* **30**: 293-331.
- Nagao, T., Fujishima, M., und Vanhoutte, P.M. (1992). Hyperpolarisation as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *Jpn.J.Pharmacol.* **58 Suppl 2**: 342.
- Nagao, T., und Vanhoutte, P.M. (1991). Hyperpolarisation contributes to endothelium-dependent relaxations to acetylcholine in femoral veins of rats. *Am.J.Physiol.* **261**: H1034-H1037.
- Nah, S.Y., Saya, D., und Vogel, Z. (1993). Cannabinoids inhibit agonist-stimulated formation of inositol phosphates in rat hippocampal cultures. *Eur.J.Pharmacol.* **246**: 19-24.
- Nelson, M.T., und Quayle, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am.J.Physiol.* **268**: C799-822.

- Nilius, B., und Droogmans, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol.Rev.* **81**: 1415-1459.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., und Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526.
- Plane, F., Holland, M., Waldron, G.J., Garland, C.J., und Boyle, J.P. (1997). Evidence that anandamide and EDHF act via different mechanisms in rat isolated mesenteric arteries. *Br.J.Pharmacol.* **121**:1509-1511.
- Popp, R., Bauersachs, J., Hecker, M., Fleming, I., und Busse, R. (1996). A transferable, beta-naphthoflavone-inducible, hyperpolarising factor is synthesised by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J.Physiol.(Lond.)* **497**: 699-709.
- Popp, R., Brandes, R.P., Ott, G., Busse, R., und Fleming, I. (2002). Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ.Res.* **90**: 800-806.
- Popp, R., Fleming, I., und Busse, R., (1998). Pulsatile stretch in coronary arteries elicits release of endothelium-derived hyperpolarising factor: a modulator of arterial compliance. *Circ.Res.* **82**: 696-703.
- Pratt, P.F., Hillard, C.J., Edgmond, W.S., und Campbell, W.B. (1998). N-arachidonylethanolamide relaxation of bovine coronary artery is not mediated by CB1 cannabinoid receptor. *Am.J.Physiol.* **274**: 375-381.
- Quignard, J..F, Feletou, M., Thollon, C., Vilaine, J.P., Duhault, J., und Vanhoutte, P.M. (1999). Potassium ions and endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig carotid and porcine coronary arteries. *Br.J.Pharmacol.* **127**: 27-34.
- Quilley, J., McGiff, J.C. (2000). Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol.Sci.* **21**: 121-124.

- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., Maoncada, S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* **2**:1057-1058.
- Rees, D.D., Palmer, R.M., Hodson, H.F. und Moncada, S. (1989). A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br.J.Pharmacol.* **96**: 418-424.
- Randall, M.D., Alexander, S.P., Bennett, T., Boyd, E.A., Fry, J.R., Gardiner, S.M., Kemp, P.A., McCulloch, A.I., und Kendall, D.A. (1996). An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **229**: 114-120.
- Randall, M.D., und Kendall, D.A. (1998). Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act via a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery. *Eur.J.Pharmacol.* **346**: 51-53.
- Rooney, T.A., und Thomas, A.P. Intracellular calcium waves generated by Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-dependent mechanisms. *Cell Calcium* **14**: 674-690.
- Sanderson, M.J., Charles, A.C., Boitano, S., und Dirksen, E.R. (1994) Mechanisms and function of intercellular calcium signaling. *Mol.Cell.Endocrinol.* **98**: 173-187.
- Sandow, S.L., und Hill, C.E. Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ.Res.* **86**: 341-346.
- Santicioli, P., und Maggi, C.A. (2000). Effect of 18beta-glycyrrhetic acid on electro-mechanical coupling in the guinea-pig renal pelvis and ureter. *Br.J.Pharmacol.* **129**: 163-169.
- Schächinger, V., Zeiher, A.M. (2000). Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction. *Z.Kardiol.* **89 Suppl 9**: 70-74.

- Taylor, S.G., Southerton, J.S., Weston, A.H., und Baker, J.R. (1988). Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. *Br.J.Pharmacol.* **94**: 853-863.
- Terragno, N.A., Terragno, A., McGiff, J.C. (1977). Contribution of prostaglandins to the renal circulation in conscious, anaesthetised and laparotomised dogs. *Circ.Res.* **40**: 590-597.
- Wartmann, M., Campbell, D., Subramanian, A., Burstein, S.H., und Davis, R.J. (1995). The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett.* **359**: 133-136.
- Weintraub, N.L., Fang, X., Kaduce, T.L., VanRollins, M., Chatterjee, P., Spector, A.A. (1997). Potentiation of endothelium-dependent relaxation by epoxyeicosatrienoic acids. *Circ.Res.* **81**: 258-267.
- Widmann, M.D., Weintraub, N.L., Fudge, J.L., Brooks, L.A., und Dellsperger, K.C. (1998) Cytochrome P-450 pathway in acetylcholine-induced canine coronary microvascular vasodilation in vivo. *Am.J.Physiol* **274**: 283-289.
- White, R., und Hiley, C.R. (1997). A comparison of EDHF-mediated and anandamide-induced relaxations in the rat isolated mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.* **122**: 1573-1584.
- White, D.G., und Martin, W. (1989). Differential control and calcium-dependence of production of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin by pig aortic endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.* **97**: 683-690.
- Xia, J., Little, T.L., und Duling, B.R. (1995). Cellular pathways of the conducted electrical response in arterioles of hamster cheek pouch in vitro. *Am.J.Physiol.* **269**: 2031-2038.
- Yamamoto, Y., Imaeda, K., und Suzuki, H. (1999). Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J.Physiol.(Lond.)* **514**: 505-513.

- Zhou, D., und Song, Z.H. (2002). CB1 cannabinoid receptor-mediated tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase-related non-kinase. *FEBS Lett.* **525**: 164-168.
- Zhou, L., Kasperek, E.M., und Nicholson, B.J. (1999). Dissection of the molecular basis of pp60(v-src) induced gating of connexin 43 gap junction channels. *J.Cell.Biol.* **144**: 1033-1045.
- Zygmunt, P.M., und Hoggestatt, E.D. (1996). Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. *Br.J.Pharmacol.* **117**: 1600-1606.

## **Danksagung**

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn Professor Dr. Rudi Busse sowie PD Dr. Ralf Brandes für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die intensive und ausgezeichnete Betreuung, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei wissenschaftlichen Fragen.

Weiterer Dank gebührt HD Dr. Ingrid Fleming, durch deren Anregungen und wissenschaftliche Informationen diese Arbeit immer wieder neue Impulse erhielt.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen/Mitarbeitern des Instituts für das kollegiale Zusammenarbeiten und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Auch meinen Eltern, engen Freunden und allen, die mich während meines Medizinstudiums und den Tätigkeiten im Rahmen dieser Doktorarbeit gefördert und unterstützt haben, möchte ich von Herzen danken.

## **Curriculum vitae**

Name: Daniel Bredenkötter

Geburtsdatum: 13.11.1976

Geburtsort: Frankfurt a.M.

Adresse: Auf der Kümm 37; 56321 Rhens

E-mail: [danielbredenkoetter@gmx.de](mailto:danielbredenkoetter@gmx.de)

## **Schulbildung**

1983 – 1987: Besuch der Gerbert Grundschule in 26169 Friesoythe-Altenoythe

1987 – 1989: Besuch der Orientierungsstufe in 26169 Friesoythe-Altenoythe

1989 – 1996: Besuch des Albertus-Magnus-Gymnasiums in 26169 Friesoythe; großes  
Latinum und Abitur 1996

## **Hochschulausbildung**

04/1997 – 06/2003: Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe  
Universität in Frankfurt a.M.

03/1999: Ärztliche Vorprüfung

03/2000: Erstes Staatsexamen

04/2002: Zweites Staatsexamen

06/2003: Drittes Staatsexamen

04/2002 – 06/2003: Praktisches Jahr am Krankenhaus Nordwest in Frankfurt a.M.

seit 06/2003: Arzt im Praktikum in der Abteilung für Anästhesiologie und  
Intensivmedizin am Bundeswehrzentral Krankenhaus in Koblenz

Frankfurt a.M., den 27.01.2004





## Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **„Rolle der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1/2 an der Cannabinoid-induzierten Hemmung EDHF-vermittelter Gefäßrelaxation“**

im Institut für kardiovaskuläre Physiologie (Direktor: Prof. Dr. med. R. Busse) unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. med. R. P. Brandes mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. R. Busse und HD Dr. rer. nat. I. Fleming ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Wesentliche Inhalte der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

„The extracellular regulated kinases (ERK) 1/2 mediate cannabinoid-induced inhibition of gap junctional communication in endothelial cells“

R.P.Brandes, R.Popp, G.Ott, D.Bredenkötter, C.Wallner, R.Busse & I.Fleming.

British Journal of Pharmacology (2002) **136**, 709-716.



Frankfurt, den 27.01.2004

.....  
(Ort, Datum)

.....  
(Unterschrift)